

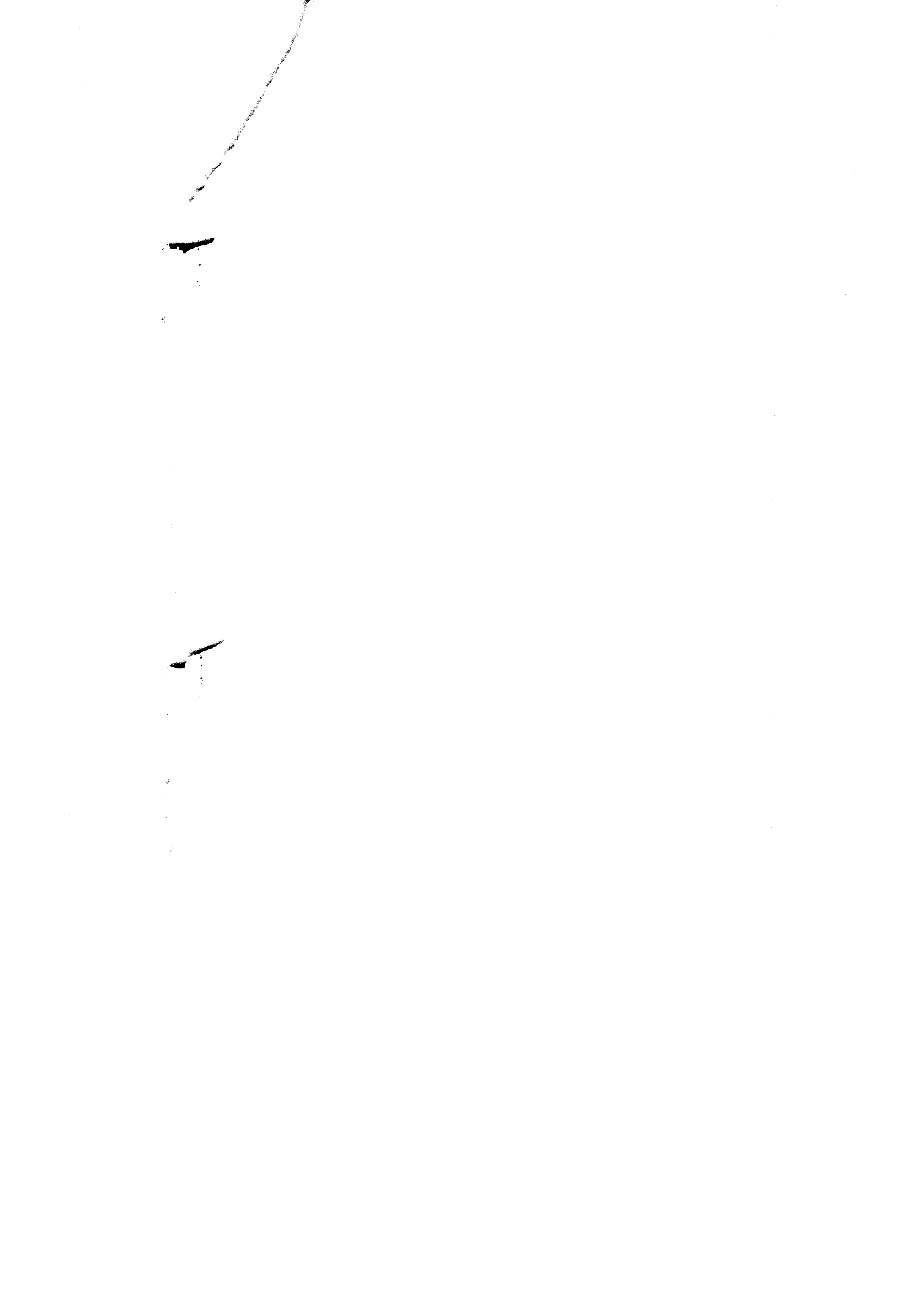
كلية التربية النوعية
قسم الاقتصاد المنزلى

الكيمياء الحيوية العملى

إعـــــــــداد
الأستاذ الدكتور
صلاح مصطفى محمود سعد
أستاذ الكيمياء ووكيل كلية الزراعة
لشئون التعليم والطلاب - جامعة بنـها

اسم الطالب: ....
القســــم: ....
رقم المعمل : ....

٢٠٠٨/٢٠٠٧



تقييم الطالب في الدروس العملية

إسم الطالب : .... القسم: ....

الدرس العملي	التاريخ	الدرجة	توقيع المشرف
الأول			
الثاني			
الثالث			
الرابع			
الخامس			
السادس			
السابع			
الثامن			
التاسع			
العاشر			
الحادى عشر			
الثاني عشر			
الإمتحانات التطبيقية والنظرية:			
الإمتحان الأول			
الإمتحان الثاني			
الإمتحان الثالث			
الإمتحان الرابع			
الإمتحان الخامس			

البـــاب الأول

"المحاليل المنظمة والحموضة " Buffer solutions and pH

أولاً : الأحماض والقواعد Acids and bases

إن دراسة الأحماض والقواعد يعتبر موضوعا هاماً ومتشعبا وإن كان تم دراسته فى مقررات الكيمياء التحليلية ولكن هنا سوف نتناوله بشئ من التبسيط لتوضيح العلاقة بين الأحماض العضوية والقواعد العضوية وكيفية المحافظة على درجة حموضة الجسم ودور ذلك فى إتمام التفاعلات الحيوية داخل الخلية الحية.

تعريف : تبعاً للتصور الحديث (Brönsted and Lowry) فإنه يمكن تعريف الأحماض بأنها تلك المواد التى لها القدرة على التفكك معطية أيونات أيدروجين H^+ أى proton donors

$$Acid \rightleftharpoons Base + H^+$$

أما القواعد فهى تلك المركبات التى لها القدرة على إكتساب البروتونات، أى تعتبر proton acceptors

$$Base + H^+ \rightleftharpoons BH$$

وهناك بعض الشقوق الأيونية أو المركبات تعمل كقاعدة وكحمض وتعرف هذه المركبات باسم المواد الأمفوتيرية amphoteric ويطلق عليها أيضاً إصطلاح Ampholytes .

التعادل : يعتبر التعادل هو تفاعل البروتون H^+ مع أيون الهيدروكسيل وإعطاء ماء ضعيف التأثير

$$H^+ + {}^-OH \rightleftarrows H_2O$$

جدول (١) بعض الأمثلة للقواعد والأحماض

Acid		**Congugated base**
$H\,Cl$	$\longrightarrow$	$H^+ + Cl^-$
$CH_3\,COOH$	$\rightleftarrows$	$H^+ + CH_3\,COO^-$
NH_4^+	$\rightleftarrows$	$H^+ + NH_3$
$H_2\,CO_3$	$\rightleftarrows$	$H^+ + H\,CO_3^-$
HCO_3^-	$\rightleftarrows$	$H^+ + CO_3$
$H_2\,O$	$\rightleftarrows$	$H^+ + OH^-$
$H_3\,O$	$\rightleftarrows$	$H^+ + H_2\,O$

ثانياً : تركيز أيون الهيدروجين ودرجة الحموضة:

يلاحظ أن تركيز أيـون الهيدروجيـن لأغلـب المحـاليل أنهـا ضئيلـة جـداً فمثــلا تركـيز أيـون الهيدروجيـن لـدم الإنسـان للشــخص العــادى يســاوى ٢٥,. × ١٠ ^-٦^ مـول / لتر وللتعبـير عـن ذلـك فـى الإسـتخدامات العمليـة نجـد صعوبة بالغة – لذلك فأنه من الأسـهل التعبـير عـن تركـيز أيونـات الأيدروجيـن بأخذ اللوغاريتم السالب وهو ما يطلق عليه بالـ pH .

$$\text{Plasma } [H^+] = 0.000\,000\,025 = 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol/l},$$

$$\text{Plasma pH} = -\log(2.5 \times 10^{-7}) = 7.4$$

وكذلك فأنه فى حالة الماء فإن تحلله ضعيف جداً على درجة ٢٥م° وتركيز أيون الهيدروجين به فقط ١٠ ^-٧^ مول / لتر .

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

وثابت التحلل المائى للماء يحصل عليه كما يلى

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

وحيث أن تركيز الماء يعتبر ثابت – فإنه يمكن كتابة المعادلة السابقة كما يلى

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

وبما أنه حاصل ضرب $[H^+][OH^-]$ = ١٠ ^-١٤^ فإن درجة الـ pH للماء النقى تساوى ٧ على درجة حرارة ٢٥ °م .

$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$$

$$pH = -\log_{10}[H^+] = 7$$

ويلاحظ فى الماء النقى أن تركيز أيونات الهيدروجين يساوى تركيز أيونات الهيدروكسيل واللوغاريتم العشرى السالب لكل منها يساوى ٧ . وقد إتفق على إستبدال $\log_{10}$ - بالحرف p لذا يسمى اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين $p [H^+] = - \log [H^+]$ وللتسهيل تكتب pH .

وبنفس الكيفية لأيونات الهيدروكسيل فانه

$$- \log [OH^-] = p [OH^-] = p\,OH = 7$$

ولذلك فإن الماء المقطر النقى يكون له درجة حموضة تساوى درجة القلوية $pH = pOH = 7$.

وعموما فإنه يقتصر على إستخدام درجة الحموضة pH فى معظم الأحيان . وحيث أن المحاليل المائية بصفة عامة تكون H^+ , OH^- لهـا علاقة عكسية معا حيث أن بزيادة أحدهما يتناقص الأخر بنفس النسبة بحيث يكون $[H^+] [OH^-] = 10^{-14}$ وكذلك $pH + pOH = 14$. المحاليل الحامضية يزداد فيها تركيز أيون الهيدروجين ($> 10^{-7}$) وبذلك ينخفض الـ pH عن 7 فى المقابل يرتفع الـ pOH نظراً لإنخفاض تركيز أيونات الأيدروكسيل عن 10^{-7} (أى $< 10^{-7}$) والعكس صحيح حيث فى المحاليل القاعدية يقل تركيز أيون الأيدروجين (H^+) عن 10^{-7} ($< 10^{-7}$) وبذلك يرتفع قيمة pH عن 7 وبنفس الكمية تنعكس قيم الـ pOH ، $[OH^-]$

H	pH	^{-}OH	pOH	
10^{-1}	1	10^{-13}	13	
10^{-2}	2	10^{-12}	12	
10^{-3}	3	10^{-11}	11	
10^{4}	4	10^{-10}	10	
10^{-5}	5	10^{-9}	9	
10^{-6}	6	10^{-8}	8	
10^{-7}	7	10^{-7}	7	محلول متعادل
10^{-8}	8	10^{-6}	6	
10^{-9}	9	10^{-5}	5	
10^{10}	10	10^{4}	4	
10^{-11}	11	10^{-3}	3	
10^{12}	12	10^{-2}	2	
10^{-13}	13	10^{-1}	1	
10^{-14}	14	10	0	

والأحماض منها القوى ومنها الضعيف ويعتمد ذلك على قدرة جزئ الحمض على التأين وإعطاء بروتونات الهيدروجين H^+ أى

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$$

فالأحماض القوية هى التى تتفكك أو تنقسم كلية وتتحول إلى أيونات (K_a كبيراً جدا) ويمكن كتابة التفاعل فى إتجاه واحد كما يلى : $AH \longrightarrow A^- + H^+$ مثل حمض الهيدروكلوريك H_Cl والكبريتيك $H_2\ SO_4$ وثلاثى كلوروخليك $C\ Cl_3\ COOH$ ، النيتريك $H\ NO_3$.

أما الأحماض الضعيفة فهى التى لها القدرة على إعطاء أيونات H^+ ضعيفة وقدرتها على التأين ضعيفة والتفاعل يكون عكسيا وتخضع لثابت التأين

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$$

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

والتى يمكن معرفة تركيز H^+ ومنها الـ pH للحامض وبنفس الكيفية ينطبق الكلام على القلويات (القواعد) من حيث قدرتها وضعفها . وبصفة عامة فإن معظم الأحماض والقلويات العضوية تكون ضعيفة جدا لا تؤثر على التفاعلات البيولوجية داخل أعضاء الكائن الحى مثل حامض الخليك $CH_3\ COOH$ وحامض الأكساليك $H_2\ C_2\ O_4$ وحامض الفوسفوريك $H_3\ PO_4$ والأحماض الأمينية والدهنية .

ثالثاً : المحاليل المنظمة : Buffer solutions

١ المحلول المنظم هو الذى يقاوم التغيرات فى رقم الحموضة pH وذلك بإضافة الأحماض أو القلويات – وتلك المحاليل تستخدم فى كثير من التجارب البيوكيميائية حيث تحتاج إلى المحافظة على رقم الـ pH أو الحموضة طوال فترة التجربة . كما أن المحاليل المنظمة تفيد فى المحافظة على وسط التفاعل الفسيولوجى داخل الخلية أو العضو أو المحاليل الفسيولوجية وذلك بسبب أن التفاعلات الحيوية معظمها تفاعلات انزيمية والتى تحتاج إلى درجة حموضة pH معينة حيث تقوم بنشاطها على أكمل وجهه وبتغير درجة الحموضة تنخفض درجات نشاط هذه الإنزيمات وبالتالى تؤثر على النشاط الحيوى وقد يؤدى إلى توقفها والوفاه .

وتبعا لمعادلة هندرسون – هاسلبالش Henderson - Hasselbalch equation فإن الـ pH الخاص بالمحلول المنظم تعتمد على عاملين أولهما ثابت إنقسام الحمض pK_a أو القاعدة pK_b وثانيهما هو النسبة بين تركيز الملح إلى الحمض أو القاعدة .

مكونات المحاليل المنظمة

تنقسم المحاليل المنظمة إلى قسمين رئيسيين

١ – أحماض ضعيفة مع أحد أملاحها

٢ – قواعد ضعيفة مع أحد أملاحها

أمثلة

1 - CH_3COOH + CH_3COONa

2 - NH_4OH + NH_4Cl

3 - Na_2CO_3 + $NaHCO_3$
4 - $NaHCO_3$ + H_2CO_3
5 - H_3PO_4 + NaH_2PO_4
6 - NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4

ميكانيكة عمل المحاليل المنظمة

النوع الأول : حمض ضعيف وأحد أملاحها

إذا إفترضنا أن لدينا محلول منظم مكون من خلات الصوديوم وحمض الخليك فإن إضافة أحد الإحماض القوية كحامض HCl (حمض الأيدروكلوريك) فإنه فى هذه الحالة يتفاعل الحمض مع خلات الصوديوم مكونا ملح كلوريد الصوديوم وحمض الخليك تبعا للمعادلة التالية

$$CH_3COONa + HCl \longrightarrow CH_3COOH + NaCl$$

وبالتالى فإن إضافة الحمض القوى إلى المحلول المنظم تحول إلى حامض ضعيف وبالتالى يصبح الحمض الضعيف تأثيره طفيف على تغير الـ pH بالإضافة إلى الملح المتعادل الذى لا تأثير له على الـ pH .

أما فى حالة إضافة قاعدة قوية مثل الصودا الكاوية NaOH فأنه فى هذه الحالة تتفاعل الصودا الكاوية مع حمض الخليك وتعطى خلات الصوديوم الذى له تأثير ضعيف على تغير الـ pH .

$$CH_3COOH + NaOH \longrightarrow CH_3COONa + H_2O$$

النوع الثانى : قاعدة ضعيفة مع أحد أملاحها

إذا إفترضنا أننا لدينا محلول منظم مكون من NH_4OH , NH_4Cl فأنه بإضافة حامض قوى مثل HCl يتكون NH_4Cl مع الماء تبعا للمعادلة التالية :

$$NH_4OH + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_2O$$

وبالتالى فإن إضافة الحمض القوى إلى المحلول المنظم أدى إلى إختفائه وتحوله إلى ملح ذو تأثير حامضى ضعيف وماء متعادل أى أدى إلى الفعل التنظيمى والمحافظة على عدم الإرتفاع المفاجئ فى درجة الـ pH . ومن الجانب الأخر فإنه بإضافة قاعدة قوية مثل Na OH إلى المحلول المنظم فأنه يودى إلى تحوله إلى ملح متعادل وقلوى ضعيف التأثير تبعا للمعادلة التالية :

$$NH_4Cl + NaOH \longrightarrow NH_4OH + NaCl$$

ويستمر فعل المحلول المنظم طالما وجدت مكوناته أما إختفاء أحد شقيه (نتيجة إستهلاكه بإضافة كمية كبيرة من الأحماض أو القواعد القوية) فإن الفعل التنظيمى للمحلول المنظم ينتهى ولم يعد محلولاً منظماً .

كما أن وجود شقى المحلول المنظم (مكوناته) بتركيز عالى يزيد من كفائته كمحلول منظم ولكن يجب مراعاة أن زيادة التركيز إلى حد معين يؤثر على فاعلية التفاعلات الإنزيمية والحيوية من حيث الضغط الإسموزى والجهد الكهربائى وفعل الأيونات من حيث تنافرها أى (إنخفاض القوة الأيونية النشطة ionic strength)

<u>مثال (١)</u> : ما هى درجة الـ pH لمخلوط متكون من ٥ ملليمتر (٠,١ مول/لتر) خلات صوديوم و ٤ ملليلتر (٠,١ مول/لتر) حمض خليك ؟

الحل تركيز خلات الصوديوم = $\frac{٥}{٩}$ × ٠,١ مول/لتر

تركيز حمض الخليك = ٤/٩ × ٠,١ مول/لتر

ثابت إنقسام حمض الخليك على درجة ٢٥ °م = ٤,٧٦

وحيث أن معادلة حساب درجة الـ pH للمحاليل المنظمة تساوى

$$pH = pK_a + \log \frac{C_{salt}}{C_{acid}}$$

لذلك فإن

$$pH = 4.76 + \log \frac{5}{9}$$

$$= 4.76 + (+0.097)$$

$$= 4.86$$

<u>مثال (٢)</u> بين كيف تتغير درجة الـ pH عند إضافة ١ ملليلتر من حمض الخليك قوته ٠,١ مول/لتر إلى المحلول السابق.

<u>الحل</u> بإضافة حمض الأيدروكلوريك فإن أيونات الهيدروجين ترتبط مع أيون الخلات لتكون $CH_3\ COOH$ وبذلك فإنه كمية الخلات تتناقص وتزداد كمية حمض الخليك الغير متحلل بنفس المقدار وبالتالى فإن نسبة الملح إلى الحمض ستتغير عن النسبة الأصلية وبالتالى تتغير قيمة الـ pH

تركيز أيون الخلات = ٥/١٠ × ٠,١ -- ١/١٠ × ٠,١ = ٠,٠٤ مول /لتر

تركيز حمض الخليك = ٤/١٠ × ٠,١ + ١/١٠ × ٠,١ = ٠,٠٥ مول /لتر

ولذلك :

$$pH = 4.76 + \log \frac{0.04}{0.05}$$
$$= 4.76 + (-0.097)$$
$$= 4.66$$

يتضح من المثال السابق أن إضافة ١ مل من حمض الأيدروكلوريك إلى المحلول المنظم السابق أدى إلى إنخفاض الـ pH من ٤,٨٦ إلى ٤,٦٦ أى إلى تغير طفيف مقداره ٠,٢ بينما إذا أضيفت نفس الكمية من الحمض ١ ملليلتر (١ و مول/لتر) إلى الماء المقطر فإن درجة الـ pH فى هذه الحالة ستصبح ٢ لأن حسابها سيكون على أساس أن المحلول عبارة عن حمض أيدروكلوريك

$$pH = -\log 10^{-2} = +2 .$$

وبالتالى يتضح أن المحاليل المنظمة لها فائدة عظمى فى المحافظة على درجة الـ pH فى الأنظمة الفسيولوجية المختلفة سواء فى أنسجة النبات أو الحيوان .

المحاليل المنظمة الفسيولوجية Physiological Buffers

ويقصد بها المحاليل الطبيعية أى التى توجد فى الكائن الحى وتقوم بعملها طبيعيا لتحافظ على الظروف الفسيولوجية للتفاعلات الحيوية المختلفة (حول pH = 7) ومن هذه المحاليل المنظمة الطبيعية ما يلى :

(أ) محاليل البيكربونات Bicarbonates

وهى تتكون من حمض الكربونيك الناتج أساسا من ذوبان CO_2 فى الماء

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$$

أما الشق الملحى فيتكون من البيكربونات HCO_3^- الناتجة من تأين حمض الكربونيك – وهذا المحلول المنظم (حمض الكربونيك والبيكربونات) مهم فى تنظيم الـ pH فى الجسم حيث أن الدم يأخذ CO_2 من الخلايا بعد العمليات البيولوجيه والزائد يرسله إلى الرئتين ليخرج مع هواء الزفير (يتحرك فى الدم على صورة H_2CO_3 ، HCO_3^-) والـ pH المناسب للدم يكون ٧,٤ وهذا يعنى أن تركيز البيكربونات تقارب ٢٠ ضعف قدر تركيز حامض الكربونيك لأن $pK_a = 6.1$ $(Ka = 1.66 \times 10^{-4} \therefore pK_a = 6.1)$

$$pH = pK_a + \log \frac{salt}{acid}$$

لذلك فإن المحلول المنظم يكون ذو كفاءة عالية إذا كان الدم حامضى والعكس يكون تأثيره ضعيف إذا كان الدم قلوى .

(ب) محاليل الفوسفات : Phosphate buffers

وتقوم هذه المحاليل بالفعل التنظيمى داخل خلايا الجسم ولذلك فأن الخلايا تحتاج إلى كميات كبيرة من عنصر الفوسفور وبالتالى أملاح الفوسفات . والفعل التنظيمى لمحاليل الفوسفات أكفأ من البيكربونات بكثير ويمكن أن تعمل فى البلازما ولكن تركيزها قليل (0.002 M) أما فى الخلايا فالتركيز مناسب لقيامها بدورها فى الفعل التنظيمى وتعتمد أساسا على HPO_4^{-2} > $H_2PO_4^-$ وتعطى درجات pH مناسبة للخلايا والدم . (حول الـ pH = 7) ، كما أنها تستخدم فى التجارب الحيوية خارج الجسم (in vitro) .

(جـ) : الأحماض الأمينية والبروتونات Amino acids and proteins

تعمل الأحماض الأمينية كمنظمات طبيعية للمحافظة على درجة الـ pH حيث أنها تحتوى علـى مجموعتين لها القدرة على التفاعل وهى COOH - (مجموعة كربوكسيل ذو تأثير حامضى) ومجموعة الأمين NH_2 - وتعمل كمستقبلة لأيونات الهيدروجين وبذلك يكون تفاعلها كالتالى

$$\underset{\displaystyle NH_2}{R - \underset{|}{CH}} - COOH \rightleftharpoons R\ \underset{\displaystyle \overset{+}{NH_3}}{\underset{|}{CH}} - COO^-$$

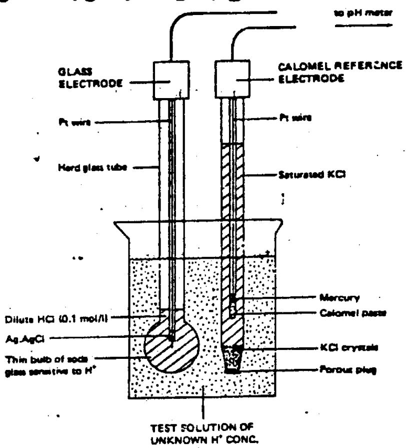
والحامض يعتبر ملحاً داخلياً Zwitter ion وله القدره على التفاعل مع الأحماض والقلويات وسيتم إيضاح ذلك فى الأجزاء النظرية خلال تناولنا لتفاعلات الأحماض الأمينية فى مقرر الكيمياء الحيوية بإذن الله تعالى .

أما بالنسبة للبروتينات بأنها تتكون من إتحاد الأحماض الأمينية مع بعضها من خلال الروابط البيتيدية والناتج أيضاً يكون مشحونا وتعمل مثل الملح الداخلى للأحماض الأمينية Zwitter ion فى كونها تتفاعل مع الأحماض والقلويات أى تقاوم تأثيرها وبالتالى لها الفعل التنظيمى فى المحافظة على درجة الـ pH . وستتم معالجة ذلك بالتفصيل فى المحاضرات النظرية فى الجزء الخاص عن البروتينات ووظائفه الحيوية المختلفة .

قياس درجة الحموضة : Measurment of pH

يتم قياس درجة الحموضة فى محلول ما وذلك بإستخدام جهاز مقياس الحموضة pH meter كما هو موضح بالشكل (١) . ويجب قبل وضع المحلول المراد قياس

درجة الحموضة له عمل إختبار للجهاز نفســه بواسـطة محـاليل قياسـية معـروف درجة الحموضة لها بالضبط وذلك حتى يمكن تحديد درجة الحموضة بكل دقة



The electrode system for the measurement of pH

شكل (١) نظام الإلكترود لقياس درجة الحموضة (pH)

الدرس العملى الأول

تقدير درجة الحموضة pH

قدر درجة الحموضة للمحاليل المختلفة الموجودة أمامك فى الزجاجة أ ، ب ، جـ ، د ، ثم قدر درجة الحموضة بعـد إضافـة ٥ مـل ، ١٠ مـل ، ٢٠ مـل حمـض أيدروكلوريك ١, ع للزجاجتين أ ، ب ، ٥ مل ، ١٠ مل ، ٢٠ مل صودا كاوية للزجاجتين جـ ، د وذلك بإستخدام جهـاز قيـاس درجـة الحموضـة pH meter وعلق على النتائج المتحصل عليها .

الباب الثانى

الكربوهيدرات Carbohydrates

تشمل الكربوهيدرات مركبات عديدة منها ما له طعم سكرى مثل سكر القصب وسكر اللبن وشراب الفركتوز ومنها عديمة الطعم مثل السليلوز والنشا ومنها أيضا من له القدرة على تكوين جيل ومواد لزجة مثل الصموغ النباتية والبكتين الذى يوجد فى كثير من النباتات كمكون لجدار الخلايا .

والكربوهيدرات من المواد الرئيسية التى تعتمد عليها كثيراً من الكائنات الحية فى الحصول على الطاقة اللازمة لها حيث تقوم بعض النباتات بتخزين الكربوهيدرات فى صورة نشا كما هو الحال فى البطاطس والبطاطا وتلعب الكربوهيدرات دورا كبيرا فى الصناعة فتدخل فى صناعة الورق والخشب الصناعى والمواد اللاصقة علاوة على دورها الرئيسى فى كثير من الصناعات الغذائية .

وتنقسم الكربوهيدرات إلى الأقسام الآتية :

١ - ***السكريات الأحادية :*** Monosaccharides

وهى الوحدة البنائية للسكريات عموما وعند تحليلها مائيا لا تعطى مركبات أبسط منها وتنقسم هذه المجموعة إلى الأقسام التالية بناء على حسب ما تحتويه من عدد ذرات كربون .

أ - ترايوز Trioses: وتمثل هذه المجموعة مركبى ألدهيد الجلسرول وثنائى هيدروكسى أسيتون .

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Dihydroxy acetone

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Glyceraldehyde

ب - تتروز : Tetroses وتمثل هذه المجموعة الأريثروز ، و الثريوز

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Threose

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Erythrose

جـ - خماسية : Pentoes مثل الأرابينوز Arabinose ، الريبوز Ribose زيلوز Xylose لكسوز Lyxose

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Lyxose

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Xylose

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Ribose

$$\begin{array}{c} CHO \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

D - Arabinose

د – سداسية : Hexoses مثل الجلوكوز ، جلكتوز والمانوز والفركتوز .

D - Fructose	D - Mannose	D - Galactose	D - Glucose
CH_2OH	H - C = O	H - C = O	H - C = O
C = O	HO - C - H	H - C - OH	H - C - OH
HO - C - H	HO - C - H	HO - C - H	HO - C - H
H - C - OH	H - C - OH	HO - C - H	H - C - OH
H - C - OH	H - C - OH	H - C - OH	H - C - OH
CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH

والسكريات السابقة إما أن تكون الدهيدية (الدوزات Aldoses) مثل المانوز والجلكتوز او كيتوز مثل الفركتوز .

٢ – ***السكريات الثنائية Disaccharides*** وهذه السكريات أما مختزلة reducing وفى هذه الحالة تكون الرابطة الجليكوسيدية بين إحدى مجاميع الهيمى أستيال وأى مجموعة أيدروكسيل أخرى خلاف مجموعة الهيمى أسيتال وبذلك توجد إحدى مجاميع الإختزال فى السكر الناتج فى صورة حرة وإذا حدث الإرتباط بين مجموعتى الهيمى أستيال فان الناتج سكر ثنائى غير مختزل Non reducing

أمثلة

سكرات مختزلة : المالتوز maltose ، لاكتوز Lactose ، سلوبيوز Cellobiose أيزومالتوز Iso - maltose .

سكرات غير مختزلة: السكروز Sucrose

٣ - سكرات عديدة *Polysaccharides*

أمثلة : النشا - الجليكوجين - البكتين - الأنيولين - الكيتين - البكتين - السيليلوز

الخواص العامة لبعض المواد الكربوهيدراتية الشائعة

أ) الجلوكوز : Glucose

سكر أحادى الدهيدى مختزل - ممكن الحصول عليه من نشا البطاطا والكاسافا والذرة وذلك بواسطة تحليل هذه المواد إنزيميا او باستخدام الأحماض - وهذا السكر يحول الضوء المستقطب نحو اليمين بمقدار ٥٢,٥ ° ويوجد فى الدم بنسبة تصل إلى ١ ٪ ويوجد مرافقا للفركتوز فى الفواكه وعسل النحل .

ب) الفركتوز Fructose

يعرف هذا السكر باسم سكر الفواكهة وهو سكر أحادى كيتوزى مختزل ويوجد بكثرة فى عسل النحل وحاليا يمكن تحضيره من شراب الجلوكوز بتحويله إنزيميا بإستخدم إنزيم جلوكوز أيزوميريز Glucose isomerase والناتج يطلق عليه شراب الفركتوز fructose Syrup حيث أنه يحتوى على ٦٠ ٪ فركتوز تقريبا و ٤٠ ٪ جلوكوز ويحول هذه السكر الضوء المستقطب نحو اليسار (- ٩٣ °) .

جـ) السكروز Sucrose

يوجد فى قصب السكر بنسبة ١٥ ٪ تقريبا وبنسبة أقل من ذلك فى بنجر السكر وهذا السكر غير مختزل بينما الناتج من تحليله مائيا يقوم بإختزال فهمنج

وبندكت يتكون من سكرى الجلوكوز والفركتوز وهذا السكر يحول الضوء المستقطب نحو اليمين (+ ٥, ٦٦ °) .

د) اللاكتوز Lactose

يوجد فى ألبان جميع الحيوانات ولذلك يطلق عليه سكر اللبن ويستخرج تجاريا من شرش اللبن بعد التخلص من القشدة والكازين وينصهر اللاكتوز عند درجة ٢٠٥ °م وله دوران ضوئى موجب (+ ٥٥ °) ويتكون من جلوكوز وجلكتوز ويختزل محلول فهلنج .

و) الجليكوجين : Glycogen

تختزن الكربوهيدرات فى الحيوانات على صورة جليكوجين حيث توجد بصفة عامة فى العضلات وخلايا الكبد وتعطى مع اليود الوانا تتفاوت من البنى إلى الأحمر والبنفسجى . وبتحليله مائيا يعطى وحدات الجلوكوز . ويعمل الجليكوجين كاحتياطى للفوسفات لجسم الحيوان نظرا لإحتوائه على حمض الفوسفوريك الذى يوجد على هيئة أستر للمجموعات الكحولية فى جزئ الجليكوجين.

ى) الأنيولين : Inulin

عبارة عن مسحوق أبيض مظهر النشا إلا أنه يتحول كله إلى فركتوز بدلا من D – جلوكوز عند تعرضه للتحليل المائى . والإينولين يعتبر المصدر الرئيسى لسكر الفركتوز ويوجد بكميات مختلفة فى البطاطس ونبات الطرطوفة وورق نبات الداليا ويعطى الإنيولين لون أصفر باهت مع اليود .

هـ) النشا : Starch

يوجد النشا بوفرة فى المملكة النباتية ويخزن فى جميع الحبوب والدرنات كمصدر إحتياطى للغذاء وتختلف حبيبات النشا فى حجمها إختلافا بينا بإختلاف مصدرها ويظهر هذا الإختلاف إذا تم فحصها تحت الميروسكوب فبينما نجد أن حبيبات نشا البطاطس سميكة ، نجد أن حبيبة نشا الأرز دقيقة جدا وتعطى جميع أنواع النشا لون أزرق مع اليود وهذا الإختبار يعتبر الأساس الذى يستخدم للكشف عن النشا .

وحبيبات النشا السليمة لاتذوب فى الماء البارد ولكن الماء الساخن يؤدى إلى إنتفاخها وأنفجارها مما يؤدى إلى تكوين محاليل لزجة وجزئ النشا يتكون من مكونين هما الأميلوز بنسبة تتراوح ما بين ١٠ – ٣٠ ٪ والأخر هو الأميلوبكتين وتتراوح نسبته من ٩٠ – ٧٠ ٪ وكلاهما عند تحليلهما بالماء ينتج جزيئات من الجلوكوز تتراوح ما بين ١٠,٠٠٠ وحدة إلى مئات الألوف .

أمثلة على إستخلاص الكربوهيدرات من مصادرها المختلفة

١- إستخلاص الكربوهيدرات الذائبة (أحادية و أوليجو) من العينات النباتية الصلبة.

١ – يتم أولا تجهيز العينة للإستخلاص عن طريق إزالة المواد الغريبة العالقة بها ثم تطحن بسرعة وتقطع إلى أجزاء صغيرة جدا.

٢ – تؤخذ من العينة وزنه معلومة بالضبط ويضاف إليها كحول ساخن ومعاد تقطيره يحتوى على مسحوق كربونات كالسيوم بكمية كافية لمعادلة الحموضة

الموجودة بالعينة ويجب إستعمال كمية كافية من الكحول بحيث يصبح تركيزه بعد إضافته للعينه حوالى ٨٠ ٪ وعلى ذلك يجب تحديد النسبة المئوية للرطوبة فى العينة .

٣ - يسخن الخليط إلى قرب درجة الغليان فى حمام مائى لمدة ٣٠ دقيقة تحت مكثف عاكس مع إستمرار التقليب ثم يرشح المحلول الكحولى ويغسل الراسب بمحلول كحول ٨٠ ٪ ويكمل إلى حجم معلوم (مع مراعاة شروط النقل الكمى).

إستخلاص الكربوهيدرات الذائبة من العصائر Juices

تستخلص الكربوهيدرات الذائبة منها بإستعمال الكحول ٨٠ ٪ ولكن بعد ترسيب المواد المصاحبة معها بواسطة خلات الرصاص المتعادلة كما يلى :

١ - يؤخذ ٢ مل من عصير الفاكهة فى أنبوبة طرد مركزى بغطاء محكم ويضاف إليها ٠,٥ مل من محلول خلات رصاص متعادلة و ١٠ مل كحول ويخلط الخليط جيدا ثم الطرد المركزى .

٢ - يؤخذ المحلول الرائق ويغسل الراسب بـ ٥ مل كحول ٨٠ ٪ وتخلط جيدا ثم يتم الطرد المركزى مرة أخرى ويؤخذ المحلول الرائق ويضاف إلى سابقه ويعتبر هذا المحلول هو الكربوهيدرات الذائبة .

خلات الرصاص المتعادلة

يذاب ٨ جم خلات رصاص فى ماء مقطر ثم تخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر

إستخلاص بعض السكريات العديدة :-

معظم السكريات العديدة توجد فى المصادر النباتية والحيوانية حرة أم مرتبطة مع البروتينات والدهون وغيرها من المركبات ولذلك فإن طريقة

إستخلاصها تتوقف على هذه العوامل (طبيعة السكر والمواد المصاحبة له ٠٠٠٠إلخ) وتختلف لذلك أيضا الطريقة المستخدمة للإستخلاص فمثلا : -

١ - يستخدم الماء الساخن لإستخلاص الإنيولين Inulin من مصادره .

٢ - تستخدم أكسالات الأمونيوم ٥ ,٠ ٪ على الساخن لإستخلاص السكريات العديدة الحامضية مثل البكتين وحمض الألجنك .

٣ - تستخدم الصودا الكاوية وحمض الأيدروكلوريك بالتعاقب لإستخلاص السليولوز من شعر القطن .

٤ - تستخدم الصودا الكاوية فى هضم المواد المصاحبة للجليكوجين (بروتين - دهون) لذلك عند إستخلاصه من الكبد لابد من الحرص الشديد عند إستخدامها .

أمثلة على إستخلاص بعض السكريات العديدة

---

١ - إستخلاص السليولوز بصورة نقية من مخلفات المزرعة كالأحطاب وبقايا المحاصيل .

١ - تؤخذ وزنه معينة من العينه المطحونه وتغلى فى الماء لمدة ٣ ساعات وذلك للتخلص من التانينات والصبغات والكربوهيدرات صغيرة الوزن الجزيئ ثم تجفف العينة

٢ - تؤخذ العينة بعد التجفيف ويستخلص منها الشموع والراتنجات والليبيدات بإستخدام مخلوط من البنزين والكحول بنسبة ١ : ١ وذلك بإستخدام جهاز سوكسلت بعد عمل ١٢ - ١٦ سيفون .

٣ - تعامل العينة المتبقية بعد الإستخلاص باكسالات الأمونيوم ٠,٥ ٪ على درجة ٨٠ °م مدة ٣ ساعات وتعاد هذه المعاملة أكثر من مرة وذلك للتخلص من البكتين ويستغنى عن هذه الخطوة فى الأنسجة الخشبية الكبيرة فى السن وذلك لوجود أراء تشير إلى تحول البكتين إلى الهيمى سيليلولوز بتقدم النبات فى العمر.

٤ - يؤخذ المتبقى ويعامل بخليط من مادة كلوريت الصوديوم $Na\ OCl_2$ فى وسط حامضى (حامض خليك ثلجى) ووسط مائى على درجة ٨٠ °م لمدة ٥ ساعات وذلك لإنفراد غاز الكلور الذى يتحد مع اللجنين ويحوله إلى مشتق كلور ولجنين الذائب ولابد من تكرار هذه المعاملة بالذات أكثر من مرة حتى نتأكد تماما من التخلص من اللجنين.

٥ - المتبقى من المعاملة السابقة يغسل جيداً بالماء المقطر حتى تمام التخلص من أيونات الكلور وهذا المتبقى عبارة عن الهالوسيليلوز (سليلوز + هيمى سليليوز) ويتم التخلص من الهيمى سليلوز وذلك بالمعاملة بمحلول $K\ OH$ ١٠ ٪ على درجة ٨٠ ° م لمدة ٥ ساعات ويتم غسيل العينة جيدا بعد المعاملة ويجفف وهذا هو السليولوز المراد فصله .

ومن الواضح صعوبة إستخلاص السيليلوز من المخلفات وذلك على عكس إستخلاص السيليلوز من شعر القطن وهذا يرجع إلى كثرة المواد المصاحبة للسيليلوز فى مصادره الطبيعية .

إستخلاص الجليكوجين من كبد حيوانات التجارب

١ - يعد الحيوان اولا وذلك بتغذيته على مادة غنية بالكربوهيدرات وبعد ذلك بحوالى اربع ساعات يتم ذبحه والحصول على الكبد وبسرعة يتم غمسه فى كحول مغلى وذلك لوقف النشاط الانزيعى حتى لا يتحلل الجليكوجين ثم يقطع الكبد إلى قطع صغيرة ثم يضاف إليها KOH ٢٠ ٪ ثم توضع فى حمام مائى لمدة ١٠ ق والغرض من هذه العملية هو تحليل البروتينات والدهون وتكسير جدر الخلايا فيما عدا الجليكوجين.

٢ - يتم ترسيب الجليكوجين باستخدام إيثانول ٨٠ ٪ ثم تجرى عملية طرد مركزى لفصل الجليكوجين ويمكن إختبار الجليكوجين المتكون باليود وتحليله مائياً بالاحماض المعدنية.

التحليل الوصفى للمواد الكربوهيدراتية

التمرين العملى الثانى
الإختبارات الوصفية للمواد الكربوهيدراتية

تجرى الاختبارات التالية على المواد الكربوهيدراتية التالية :

جلوكوز - فراكتوز - سكروز - لاكتوز - نشا - دكسترين

إختبــــار الذوبــــان

تختلف المواد الكربوهيدراتية فى قابليتها للذوبان فى الماء أو المواد الكربوهيدراتية الأخرى وذلك على حسب درجة تجمعها وإرتباط الوحدات المكونة لها فالسكريات الأحادية ومعظم سكرات الأوليجو تذوب فى الماء والمحاليل الكحولية بسهولة ولا تذوب تقريبا فى فى المذيبات العضوية الغير قطبية مثل الإيثير - البنزين - أما السكرات العديدة فهى لا تذوب فى الماء البارد أو شحيحة الذوبان فيه أو تكون محلول غروى مع الماء الساخن مثل النشا ومنها ما يذوب فى الماء فى وجود أيونات معينة حيث يتكون معقد ذائب .

ولإجراء إختبار الذوبان يؤخذ ٠,١ جم من السكريات المختلفة فى عدة أنابيب إختبار ويضاف إلى كل أنبوبة ٢ مل ماء بارد وترج جيدا وتعاد التجربة مع الماء الساخن - الإيثير - وتدون النتائج فى الجدول رقم (١) - ويلاحظ أن سرعة الذوبان تختلف من سكر لآخر وتقل درجة الذوبان بإرتفاع الوزن الجزيئى كما ذكر سابقا.

جـدول (١) نتـائج إختبـار الذوبـان

إسم المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

٢ – تأثير القلويات: (إختبار مور)

بتسخين محلول المواد الكربوهيدراتية مع الصودا الكاوية بتركيز ٣٠ ٪ فنجد أن المحلول يتلون أولا بلون أصفر ثم يتحول إلى الأحمر ثم الأسمر وتشم رائحة السكر المحروق وهذا مع السكريات المختزلة فقط سواء كانت أحادية أو ثنائية ولكن مع السكريات العديدة لا تعطى نتيجة ايجابية ويفسر نجاح إختبار مور مع السكريات المتخترلة إلى وجود مجموعة الكربونيل التى تحدث للجزيئات الداخلة فيها تكثيف بأعداد كبيرة مكونة مواد راتنجية لها مثل الألوان السابقة وكذلك لتكوين بعض الأحماض العضوية نتيجة لتكسير السكريات المختزلة بالقلويات مثل حمض الأكساليك والبيروفيك والأكساليك.

ولإجراء الإختبار يوضع فى أنبوبة الإختبار ٢ مل من محلول السكر ثم يضاف إليها نفس الحجم من أيدروكسيد الصوديوم ٣٠ ٪ وتغلى فى حمام مائى لمدة دقيقتين ثم يبرد المحلول ويضاف إليه حجم متساوى من محلول فهلنج أ ، ب ويسخن للغليان – يلاحظ عدم ظهور راسب أصفر أو أحمر دلالة على أن السكريات المختزلة فقدت مقدرتها الإخترالية بتأثير الصودا الكاوية .

جدول (٢) تأثير القلويات على السكريات المختزلة

المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

٣ - إختبــار موليــش: Molisch's test

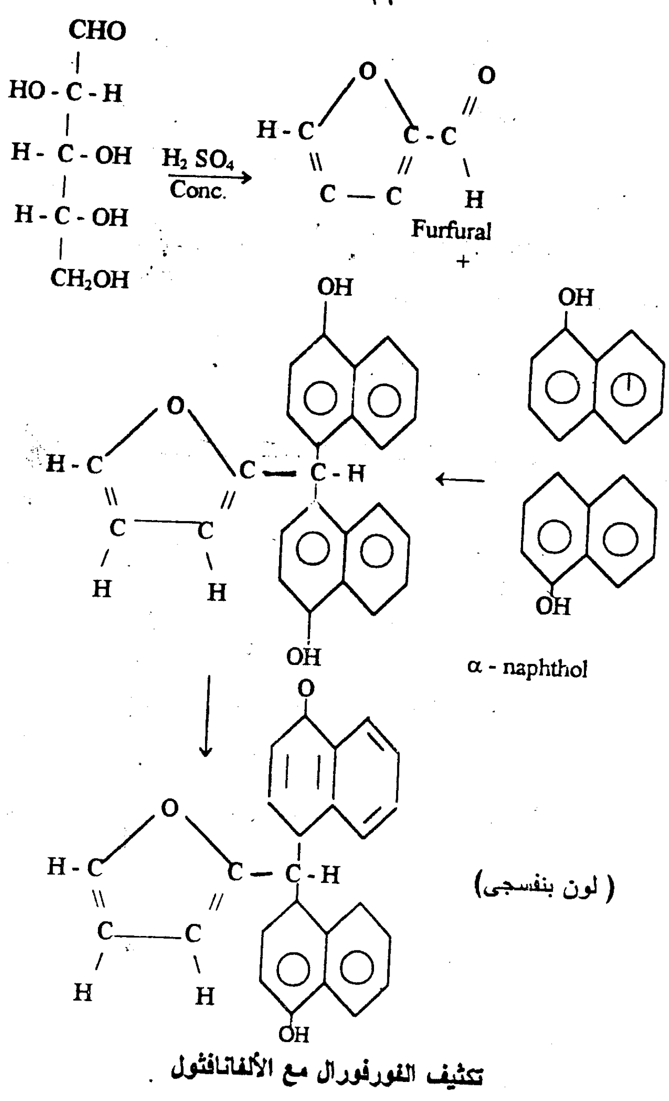
هذا الإختبار عام لجميع المواد الكربوهيدراتية وجميع المركبات العضوية التى تعطى مركب الفورفورال عند إضافة حمض الكبرتيك المركز إليها .

ويعتمد الأساس العلمى لهذا الإختبار على تكوين مركب الفورفورال عند إضافة حامض الكبرتيك المركز إلى محلول السكر وذلك نتيجة نزع ٣ جزيئات ماء ويتفاعل بعد ذلك الفورفورال الناتج مع الألفانافثول ويعطى لون بنفسجى محمر - أما السكرات السداسية Hexoses سواء الحرة منها أو الناتجة من تحليل سكرات الأوليجو أو العديدة فإنها بفعل الحامض تعطى مشتق - هيدروكسى ميثيل فورفورال ويتفاعل الاخير ويعطى لون بنفسجى محمر ومن الملاحظات الهامة عند إجراء هذا الإختبار قد يظهر لون أخضر أسفل الحلقة البنفسيجية وهذا اللون لا دخل للمركبات الكربوهيدراتية به إذ أنه ناتج من تفاعل الألفانافثول α - naphthol مع حمض الكبرتيك المركز ويلاحظ إضافة حامض الكبرتيك المركز على جدار الإنبوبة . ولإجراء الإختبار يؤخذ حوالى ٢ ملليلتر من محلول السكر ثم يضاف إليه ٣ نقط من الألفانافثول ويرج الخليط ثم يضاف حمض الكبرتيك المركز على جدار الإنبوبة ويراعى عدم الرج بعد إضافة الحمض.

جوهر كشاف موليش : محلول ٥ ٪ الفانافثول فى كحول إيثايل ٩٥ ٪ .

جـــدول (٣) نتائج إختبــار موليش مع المواد الكربوهيدراتية

المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج



تكثيف الفورفورال مع الألفانافثول .

٤ – إختبار الأنثرون للكربوهيدرات Anthrone test

يعتبر إختبار الأنثرون إختبار عام مميز للكربوهيدرات ويتفاعل الأنثرون مع الكربوهيدرات فى وجود حمض الكبرتيك المركز ويعطى لون أخضر إلى أخضر مزرق .

$$\text{Pentose} \xrightarrow[-3\,H_2O]{H_2SO_4} \text{Furfural} \xrightarrow{\text{Anthrone}} \text{green - blue complex}$$

$$\text{Hexose} \xrightarrow[-3\,H_2O]{H_2SO_4} \text{5 - hydrox methyl furfural} \xrightarrow{\text{Anthrone}} \text{green - blue complex}$$

جوهر كشاف الأنثرون Anthrone reagent

أنثرون ٠,٢ ٪ فى حمض كبرتيك مركز .

ولأجراء هذا الإختبار

١ – يؤخذ ٠,٢ محلول كربوهيدراتى فى أنبوبة إختبار ويضاف إليها بحذر شديد ٢ مل من جوهر كشاف الأنثرون .

٢ - رج الأنبوبة وأتركها فترة (٥ ق) لاحظ اللون المتكون ودونه فى جدول (٤) .

جدول (٤) نتائج إختبار الأنثرون مع المواد الكربوهيدراتية

إسم المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

٥ - إختبارات الإختزال :

السكريات الأحادية أو الثنائية أو الثلاثية المحتوية على مجموعة هيمى أسيتال حرة لها القدرة على أن تكون التركيب الأينولى فى الوسط القاعدى ، كما أن التركيب الإينولى يمتاز بقدرته الفائقة على إختزال المواد المؤكسدة بينما يتأكسد جزئ السكر إلى أحماض سكرية . ومن المواد المؤكسدة أيونات النحاسيك Cu^{++} ، الفضة Ag^{+} ، الزئبقيك Hg^{++} ، حديدوسيانيد $Fe(CN)_6$ والبزموت B_i^{++} . وقد إستغلت خاصية إختزال السكريات للمواد المؤكسدة فى التقدير الوصفى والكمى للسكريات وتوجد مجموعة مختلفة من الجواهر الكشافة

تحتوى على أحد الأيونات المؤكسة السابقة ومنها محلول فهلنج ، بندكت، وشيفر ، وهارتمان ....إلخ ومعظم هذه الجواهرتحتوى على أيون النحاسيك فى صورة ذائبة ومتأينة ويمكن تلخيص التفاعل فيما يلى : -

سكر مختزل + قاعدة ← تركيب أينولى (يتأكسد بسهولة)

+

أيون نحاسيك Cu^{++}

↓

$Cu_2O \xrightarrow{\Delta} Cu\,OH \leftarrow OH^- + Cu^+ +$ خليط من الأحماض السكرية

راسب أصفر أو أحمر

من ذلك نجد أن أيون النحاسيك يأخذ إلكترون من التركيب الإينولى الذى يتأكسد إلى أحماض سكرية بينما يختزل أيون النحاسيك إلى نحاسوز الذى يتحد مع أيون الأيدروكسيد ليكون أيدروكسيد نحاسوز الذى يتحول بالحرارة إلى أكسيد نحاسوز (راسب أصفر أو أحمر أو بنى)

$$2\,Cu\,OH \longrightarrow Cu_2O + H_2O$$

وقد وجد أن أيون النحاسيك فى الوسط القاعدى يرسب على صورة أيدروكسيد نحاسيك ولإثبات ذلك تجرى التجربة التالية :-

أ - تأثير أيون الأيدروكسيد على أيون النحاسيك :

يضاف إلى ٢ ملليلتر صودا كاوية حجم مساو من كبريتات نحاسيك فيتكون راسب أزرق من أيدروكسيد النحاسيك يقسم الناتج فى أنبوبتين تسخن إحداهما مباشرة ويضاف إلى الأنبوبة الثانية ٥ ملليلتر من محلول الجلوكوز فنجد أن الراسب يذوب . وذلك نتيجة لإحتواء جزئ الجلوكوز على عديد من مجاميع

الأيدروكسيل بينما فى الإنبوبة الأخرى فيتكون راسب إسود من أكسيد النحاسيك حسب المعادلة التالية :

$$Cu\,SO_4 + Na\,OH \longrightarrow Cu\,(OH)_2 + Na_2\,SO_4$$

$$CU\,(OH)_2 \longrightarrow Cu\,O + H_2O$$

```
     CHO                                       CHO
     |                                          |
 H - C - OH                                 H - C - O
     |                                          |       \
HO - C  - H  + Cu (OH)2 →                  HO - C - H      Cu
     |                                          |       /
 H - C - OH                                 H - C - O
     |                                          |
 H - C - OH                                 H - C - OH
     |                                          |
    CH2 OH                                     CH2 OH
```

جلوكوز

جلوكونات النحاسيك (ملح ذائب)

ونظرا لأن جلوكونـات النحاسيك ملـح ذائـب فيتـأين إلـى أيونـات نحاسـيك وأيدروكسيل وسكر وجلوكوز . ولـذا فـإن جميـع السـكريات الأحاديـة المحتويـة على أكثر من مجموعة أيدروكسيل فى إتجاه واحد تعمـل علـى إذابـة أيدروكسيد النحاسيك .

$$
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H-C-O \\
| \\
HO-C-H \\
| \\
H-C-O \\
| \\
H-C-OH \\
| \\
CH_2OH
\end{array}
\!\!\!\!\! > Cu \xrightarrow{HOH} Cu^{++} + OH^{-} +
\begin{array}{c}
CHO \\
| \\
H-C-OH \\
| \\
HO-C-H \\
| \\
H-C-OH \\
| \\
H-C-OH \\
| \\
CH_2OH
\end{array}
$$

جلوكونات النحاسيك   جلوكوز

جـــدول (٥) ذوبان راسب أيدروكسيد النحاسيك

إسم المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

ب – إختزال أيون النحاسيك بواسطة السكريات المختزلة:

يوخذ ٢ ملليلتر من محلول السكر فى أنبوبة إختبار نظيفة ثم يضاف ٢ ملليلتر صودا كاوية وترج الأنبوبة ثم يضاف ٢ ملليلتر محلول كبريتات نحاسيك (فهلنج أ) وترج جيدا ثم تسخن فى حمام مائى لمدة ٣ دقائق ودون ملاحظاتك فى الجدول التالى . ونظرا لأن المحلول به أيون نحاسيك(عامل مؤكسد)وسكر مختزل فتختزل أيونات النحاسيك إلى نحاسوز (راسب أصفر أو أحمر) ويتأكسد جزئ السكر إلى أحماض سكرية .

لذا نجد أن السكريات المختزلة لها القدرة على إختزال أيون النحاسيك – الفضة – الحديديك فى الوسط القاعدى.

جدول (٦) إختزال أيون النحاسيك بواسطة السكريات المختزلة

إسم المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

ج - إختبار فهلنج : Fehling's test

يتكون منحلول فهلنج من محلولين هما فهلنج (أ) وفهلنج (ب) .
يحضر محلول فهلنج (أ) بإذابة ٢٨, ٦٩ جرام من كبريتات النحاس $Cu\ SO_4\ 5H_2O$ فى لتر من الماء المقطر . ويحضر محلول فهلنج (ب) بإذابة ٣٤٦ جرام من ملح روشيل (طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم) (COOK - CHOH - CHOH - COO Na) وكذلك ١٢٠ جرام من الصودا الكاوية فى لتر من الماء المقطر .

ويعلل تحضير محلول فهلنج على صورة محلولين هما فهلنج (أ) وفهلنج (ب) وعدم تحضيرهم فى صورة محلول واحد هو أنه عند إضافة ملح روشيل والصودا الكاوية وكبريتات النحاسيك فى زجاجة واحدة يحدث بعد مدة طويلة أن يقوم ملح روشيل بإختزال أيونات النحاسيك ويتأكسد هو إلى داى كيتوسكسينات كما توضح المعادلة :

$$\begin{matrix} CHOH - COO\,Na \\ | \\ CHOH - COOK \end{matrix} + 4\,H_2O + Cu^{++} \longrightarrow \begin{matrix} O = C - COO\,Na \\ | \\ O = C - COOK \end{matrix} + Cu^{+}$$

داى كيتوسكسينات الصوديوم والبوتاسيوم

وعند إضافة محلول فهلنج " أ " إلى فهلنج " ب " يحدث تفاعل بين كبريتات النحاسيك والصودا الكاوية ويتكون راسب من أيدروكسيد النحاسيك الذى يذوب بسرعة فى ملح روشيل ويكون ملح معقد ذائب يتأين إلى أيون نحاسيك وملح روشيل . وبذا نضمن وجود أيون نحاسيك ذائب بإستمرار فى المحلول والمعادلات التالية توضح ذلك :

$$Cu(OH) + \begin{matrix} HO-CH-COONa \\ | \\ HO-CH-COOK \end{matrix} \longrightarrow Cu\begin{matrix} O-CH-COONa \\ | \\ O-CH-COOK \end{matrix}$$

يتأين ↓ HOH

$$2\,OH^- + Cu^{++} + \begin{matrix} HOCH-COONa \\ | \\ HOCH-COOK \end{matrix}$$

أيون نحاسيك ملح روشيل

وأيون النحاسيك يؤكسد السكر المختزل إلى أحماض سكرية ويختزل هو إلى أيون نحاسوز ويكون على صورة راسب من أيدروكسيد نحاسوز الذى سرعان ما يتحول بالتسخين إلى راسب أحمر أو أصفر من أكسيد النحاسوز.

$$R-CHO + Cu^{++} \longrightarrow R\,COOH + Cu^{+}$$

سكر مختزل

$$Cu^{+} \xrightarrow{OH^-} 2\,Cu\,OH \xrightarrow{\Delta} Cu_2O$$

حرارة — راسب أحمر أو أصفر

وتجرى التجربة كما يلى :-

يضاف ١ ملليلتر من فهلنج (أ) إلى ١ ملليلتر من محلول فهلنج (ب) فى أنبوبة إختبار وترج جيدا ثم يضاف ٢ ملليلتر من محلول سكرى وتسخن

الأنبوبة فى حمام مائى لمدة ٣ دقائق لاحظ ظهور راسب أصفر فى الحال من أكسيد النحاسوز وتدون النتائج فى جدول (٧) .

ويلاحظ النقاط التالية :

١) قد يتلون محلول فهلنج باللون البرتقالى أو الأحمر أو الأصفر وفى جميع تلك الحالات تعتبر النتيجة موجبة ويعزى إختلاف لون أكسيد النحاسوز من الأصفر إلى الأحمر إلى حجم جزيئات الراسب . فكلما كانت الجزيئات صغيرة ودقيقة كلما كان لون الراسب أصفر أما إذا كانت الجزيئات كبيرة كان لونه مائل للإحمرار .

٢) يلاحظ أن وجود أملاح الأمونيوم وكذلك الحموضة المرتفعة تعطل نجاح الإختبار على الرغم من وجود سكريات مختزلة . لذلك عند الكشف عن وجود السكريات المختزلة فى وجود أملاح الأمونيوم يجب غليان المحلول أولا بأول مع الصودا الكاوية للتخلص من أملاح الأمونيوم بالتطاير . بينما المحاليل الحامضية يلزم معادلتها أولا بقلوى قبل إجراء الإختبار .

٣) إختبار فهلنج إختبارعام للسكريات المختزلة .

د – إختبار بندكت : Bendict's Test

أدخل بندكت بعض التعديلات على محلول فهلنج وأطلق إسمه على المحلول المعدل الذى يحضر بإذابة ١٧,٣ جرام من كبريتات النحاس فى حوالى ١٠٠ ملليلتر ماء مقطر ثم يذاب فى دورق أخر ١٧٣ جرام سترات صوديوم + ١٠٠ جرام كربونات صوديوم لا مائية فى حوالى

٨٠٠ ملليلتر ماء مقطر ويسخن إذا لزم الأمر ويرشح المحلول إذا كانت شوائب غير ذائبة . ثم يضاف محلول كبريتات النحاس إلى محلول الكربونات والسترات بالتدريج مع التحريك المستمر ويكمل حجم المحلول إلى لتر والمحلول الناتج يعرف باسم (محلول بندكت) ويلاحظ أن محلول بندكت المستخدم فى التقديرات الكمية يحتوى بالإضافة إلى الأملح السابقة ثيوسيانات بوتاسيوم وحديد وسيانور البوتاسيوم .

ويمتاز محلول بندكت عن محلول فهلنج فيما يلى :

١) يحضر فى زجاجة واحدة .
٢) حساس جدا للكميات القليلة من السكريات المختزلة حتى تركيز ٠,٠٨ ٪
٣) يستخدم فى الكشف عن السكر بالبول حيث أنه لا يتأثر بالعوامل المختزلة الأخرى الموجودة بالبول مثل حمض اليوريك .
٤) الصودا الكاوية فى محلول فهلنج بالتسخين مع السكر تؤدى إلى تكسير بعض جزيئات السكر .
٥) الوسط القلوى هنا عبارة عن كربونات الصوديوم وهى التى تقوم بتحويل الصورة الحلقية إلى الصورة الإينولية .

وميكانيكة التفاعل تتم على ثلاث خطوات :

١) عند تحضير محلول بندكت تتفاعل كبريتات النحاس مع كربونات الصوديوم ويتكون راسب من كربونات النحاس ويذوب بسرعة بواسطة سترات البوتاسيوم .

$$Cu\,SO_4 + Na_2\,CO_3 \longrightarrow Cu\,CO_3 \downarrow + Na_2\,SO_4$$

٢) تتحول كربونات النحاسيك إلى ملح ذائب فى سترات الصوديوم والنحاسيك نتيجة لتفاعلها مع سترات الصوديوم .

$$Cu\,CO_3 + HO-\underset{\underset{CH_2-COO\,Na}{|}}{\overset{\overset{CH_2-COO\,Na}{|}}{C}}-COO\,Na \longrightarrow H_2\,CO_3 +$$

$$Na\,OO\,C-\underset{\underset{CH_2-COO\,Na}{|}}{\overset{\overset{CH_2-COO\,Na}{|}}{C}}-O-Cu-O-\underset{\underset{CH_2-COO\,Na}{|}}{\overset{\overset{CH_2-COO\,Na}{|}}{C}}-COO\,Na$$

سترات الصوديوم والنحاسيك (ملح ذائب)

٣) الملح الذائب المتكون يتأين فى الوسط المائى إلى سترات صوديوم وأيون نحاسيك وبهذا نضمن إستمرار وجود أيون النحاسيك (العامل الموكسد) فى حالة ذائبة التى تقوم بأكسدة السكر.

$$HO-\underset{\underset{CH_2-COO\,Na}{|}}{\overset{\overset{CH_2-COO\,Na}{|}}{C}}-COO\,Na + Cu^{++} + 2OH^- \xleftarrow{H.OH} \text{Sod. Capric Citrate}$$

كيفية إجراء إختبار بندكت:

، يضاف إلى حوالى ٥ ملليلتر محلول بندكت حوالى ١ ملليلتر من المحلول السكرى ويوضع فى حمام مائى ساخن لمدة دقيقتان . ثم تترك الأنبوبة لتبرد ببطء ويلاحظ أنه فى حالة وجود سكريات مختزلة يتكون راسب أحمر اللون أو أصفر كما فى حالة محلول فهلنج ·

تدون النتائج فى جدول (٧)

هـ- إختبار حمض البكريك : Picric acid test

أضف إلى ٥ ملليلتر من المحلول السكرى من ٢ - ٤ ملليلتر من حمض البكريك (محلول مشبع) ثم يضاف ١ ملليلتر من محلول أيدروكسيد الصوديوم أو كربونات الصوديوم وتسخن الإنبوبة فى حمام مائى لمدة ٣ دقائق لاحظ تغير لون المحلول من الأخضر إلى الأحمر فى حالة وجود سكريات مختزلة وذلك نتيجة لإختزال حامض البكريك إلى حمض ألبكراميك وتدون النتائج فى جدول (٧) ·

OH, NO_2, NO_2, NO_2 → (Red) → OH, NO_2, NH_2, NO_2

Picric acid أصفر

Picramic acid أحمر

و - إختبار نترات الفضة النشادرية:

يحضر محلول نترات الفضة النشادرية وذلك بنقل ٥ ملليلتر من محلول نترات الفضة فى أنبوبة إختبار ثم يضاف إليها نقطتين من الصودا الكاوية - يلاحظ تكوين راسب رمادى من أيدروكسيد الفضة - ثم يضاف أيدروكسيد الأمونيوم بالتدريج حتى تمام ذوبان الراسب وبذلك يتكون أيون الفضة النشادرية.

كيفية إجراء الإختبار :

يؤخذ ٣ ملليلتر من محلول نترات الفضة النشادرية ويضاف إليها حوالى ٢ ملليلتر من محلول السكر المختزل ويسخن فى حمام مائى للغليان . يلاحظ تكوين راسب إسود من أكسيد الفضة (فى حالة ما إذا كانت الإنبوبة غير نظيفة من الداخل) أو مرآة لامعة على جدران الإنبوبة من الداخل . وتدون النتائج فى جدول (٧) وهذا الإختبار عام لجميع السكريات المختزلة .

$$AgNO_3 + NaOH \longrightarrow AgOH + NaNO_3$$

$$AgOH + 2\,NH_4OH \longrightarrow Ag(NH_3)_2OH + 2\,H_2O$$

$$R-CHO + Ag(NH_3)_2OH \longrightarrow R-COOH + Ag$$

جـدول (٧) نتـائج تجرب الإختــزال

المادة	فهلنج	بندكت	حمض البكريك	نترات الفضة	الإستنتاج

ويلاحظ أن جميع تجارب الإختزال السابقة تجرى فى وسط قلوى للأسباب التالية:

١) السكريات المختزلة توجد بنسبة ٩٥ ٪ فى الصورة الحلقية فى المحاليل المتعادلة بنسبة ٥ ٪ للصورة الألدهيدية النشطة كعامل مختزل . لذا فإضافة القلوى يؤثر على الصورة الحلقية حيث يعمل على تحويلها إلى التركيب الإينولى النشط .

٢) أيون أيدرووكسيل القلوى فى حالة تجارب فهلنج وبندكت يتفاعل مع أيون النحاسوز مكون أيدروكسيد نحاسوز الذى يتحول بالتسخين إلى راسب أكسيد نحاسوز .

٣) السكريات المختزلة الألدهيدية أو الكيتونية تتحول فى الوسط القلوى إلى الصورة الإينولية ذات القوة الإختزالية الكبيرة . وهذا يفسر لماذا يعطى سكر الفراكتوز (سكر كيتونى) نتيجة موجبة مع تجارب الإختزال المحتوية على مواد مؤكسدة ضعيفة .

التمرين العملى الثالث

إختبارات خاصة للتمييز بين السكريات المختلفة

١ - إختبار بارفويد Barfoed's test

يستخدم هذا الإختبار للتمييز بين السكريات الأحادية والثنائية المختزلة ويسير هذا التفاعل مثل إختبارات الإختزال التى يدخل فيها أيون النحاسيك (Cu^{++}) كعامل مؤكسد مثل إختبار فهلنج وبندكت ولكن يختلف عنها فى أنه يحتوى على حمض الخليك كوسط حامض ونظرا لهذا الوسط الحامضى فإن السكريات الأحادية المختزلة تتفاعل أسرع من السكريات الثنائية المختزلة وذلك يرجع إلى أن القدرة الإختزالية للسكريات الأحادية ضعف القدرة الإختزالية للسكريات الثنائية كما يلاحظ أن كثافة الراسب أقل بكثير كما هو فى إختبارى فهلنج وبندكت . وقد تستجيب السكريات الثنائية مع جوهر بارفويد لمدة طويلة

مما يؤدى إلى تحلل السكر الثنائى المختزل أو الغير مختزل مائيا بفعل حمض الخليك والتسخين .

$$R{-}CH{=}O + 2\,Cu^{2+} + 2\,H_2O \longrightarrow R{-}COOH + Cu_2O\downarrow + 4\,H^{+}$$

محلول كشاف بارفويد :

يذاب ١٣,٣ جرام من بللورات خلات النحاس المتعادلة فى ١٠٠ مل محلول حمض خليك ثلجى .

طريقة إجراء الإختبار :

يوخذ ٠,٥ مل من محلول السكر المختبر فى أنبوبة إختبار ويضاف إليها ٢ مل من محلول بارفويد ويسخن للغليان لمدة دقيقة واحدة - تترك الإنبوبة لتبرد فيلاحظ ظهور راسب أحمر بسيط فى قاع الإنبوبة فى حالة السكريات الأحادية المختزلة .

جدول (٨) إختبار بارفويد Barfoed's

المادة	المشاهدة	الإستنتاج

٢ - اختبـــار سليفانوف (الريزورسينول) للسكريات الكيتونية .

Resorcinol - H Cl (Selivanoff) test for ketoses

يميز هذا الإختبار بين الكيتوزات مثل الفركتـوز والألـدوزات مثـل الجلوكوز أو المانوز ويستخدم هذا الإختبار أيضا للكشف عن وحدة السكر الكيتونى فى السكريات الأوليجو أو العديدة وعلـى ذلك فهو موجب مع سكر الفركتوز وأى سكر أخر يحتوى ف تركيبة على الفركتـوز مثل السكروز حيث يتحلل الأخير مائيا بواسطة H Cl الداخل فى جوهر كشاف سليفانوف إلى جلوكوز وفركتوز .

عند تسخين السكريات الخماسية Keto pentoses الكيتونية مـع حمض الأيدروكلوريك فإنها تعطى بسرعة مركب الفورفورال وأيضا السكريات السداسية Keto hexoses الكيتونية تعطى بسرعة مركب ٥ هيدروكسى ميثـايل الفورفـورال، وكـلا مـن الفورفـورال أو ٥ هيدروكســى ميثـايل الفورفـورال، المتكونين بسرعة تتفاعل مع الريزورسينول وتعطى لون أحمر كما فى الشكل التالى .

ولو أستمر الغليان مع السكريات الألدهيدية فترة أطول من الـلازم نحصل علـى نفس النتيجة حيث أنها فى ظروف التفاعل تخضع لعملية الـ Tautomerism ويتكون فيها سكريات كيتونية ويجب الا يزيد تركـيز حمض H Cl عن ١٢ ٪ والغليان لا يزيد عن ٢٠ - ٣٠ ثانية (½ دقيقة) وأحيانا قد نحصل على رواسب لونها أحمـر ٠٠٠٠ بنـى كنتيجة موجبة وهذه الرواسب تذوب فى الكحول وعلى ذلك فإنه بإضافة الكحول (الإيثـايل) لها يزداد اللون الأحمر فى المحلول .

جوهر كشاف سليفانوف : يحضر محلول ٠,٥ ٪ من الريزوسينول فى محلول حمض هيدروكلوريك مخفف ١ : ٢ .

H OH$_2$ C - C ... C = O + Resorcinol → HO CH$_2$ ... OH

Resorcinol

تسخين Δ

لون أحمر

HOH$_2$ C - C ... O ... OH

تفاعل الفورفورال أو ٥ هيدروكسى ميثايل الفورفورال مع الريزورسينول

ويجرى الإختبار بوضع ٥ مل محلول جوهر كشاف الريزوسينول يضاف إليها ½ مل محلول السكر المختبر ويسخن للغليان (٢٠ - ٣٠ ثانية) . فيتكون راسب أحمر دموى يذوب فى الكحول فهذا يدل على أن السكر به مجموعة كيتونية.

ويجرى هذا الإختبار مع محلول الجلوكوز - الفراكتوز - المالتوز . وتدون النتائج فى الجدول التالى :

جدول (٩) نتائج إختبار سليفانوف

المادة	المشاهدة	الإستنتاج

٣ - إختبار الأوسازون **Osazone test**

تتفاعل السكريات المختزلة مع الفينايل هيدرازين فى وجود خلات الصوديوم وتتكون بللورات صفراء تسمى أوسازونات Osazones ذات أشكال بللورية مميزة وتحت ظروف معينة ، عادة ما تعطى السكريات المختلفة

فى التوزيع الفراغى لمجاميع الهيدروكسيل على جزئ السكر أوسازون خاص به والتفاعل الذى يؤدى إلى تكوين الأوسازون كما يلى :

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ R \end{array} + H_2NH\,C_6H_5 \xrightarrow[-H_2O]{} \begin{array}{l} CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ CH\,OH \\ | \\ R \end{array}$$

Aldose Phenyl hydrazine Phenyl hydrazone

$$\begin{array}{l} CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ CHOH \\ | \\ R \end{array} + H_2N\,NH-C_6H_2 \rightarrow \begin{array}{l} CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ C=O \\ | \\ R \end{array} + NH_3 + C_6H_5NH_2$$

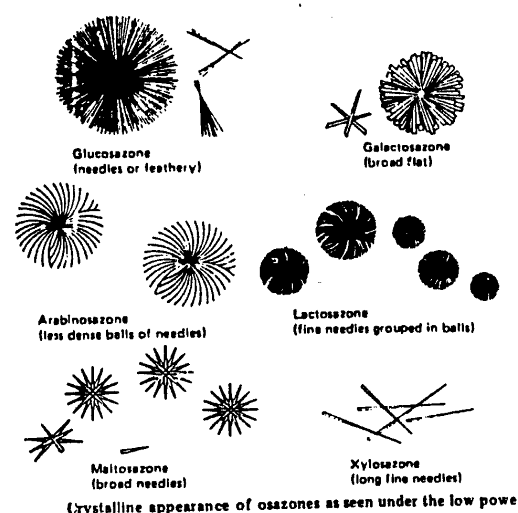
Phenyl hydrazone

$$\begin{array}{l} CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ C=O \\ | \\ R \end{array} + NH_2\ NH-C_6H_2 \rightarrow \begin{array}{l} CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ CH=N-NH\,C_6H_5 \\ | \\ R \end{array}$$

Osazone

ويلاحظ أن الجلوكوز والمالتوز والفراكتوز (السكرات الأبيمارية بصفة عامة) تعطى نفس الشكل البللورى للأوسازون وذلك يرجع إلى أن الشكل الفراغى لتوزيع المجموعات حول ذرات الكربون ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ متشابهه فى كل منها.





Crystalline appearance of osazones as seen under the low power of a microscope

الشكل البللوري للأوسازون المتكون بواسطة تفاعل بعض السكريات مع الفينيل هيدرازين

كيفية إجراء الإختبار:

١) يوضع فى أنبوبة جافة نظيفة ٢,٠ جم فينيل هيدرازين هيدروكلوريد ثم يضاف ١. جم من المادة الكربوهيدراتية يوضع ١,٠ جم من خلات الصوديوم إذا كان مركب الفينيل هيدرازين على صورة كلوريد أما إذا كان على صورة فينيل هيدرازين فقط فيضاف ٥,٠ ملليلتر حمض خليك بدلا من خلات الصوديوم ويضاف إلى المزيج ٣ ملليلتر ماء مع الرج الشديد ثم توضع الإنبوبة فى حمام مائى لمدة ١٥ دقيقة .

٢) عندما تبرد الإنبوبة يلاحظ ظهور بللورات ذات لون أصفر .

٣) توخذ بعض البللورات ويجرى فحصها تحت الميكروسكوب وترسم شكل البللورة.

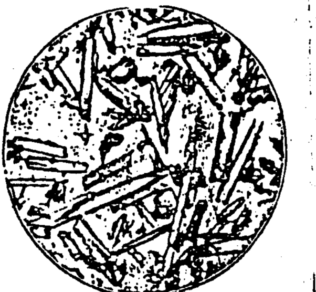
٤) يجرى إختبار الأوسازون على السكريات : جلوكوز - فراكتوز - لاكتوز - مانوز - مالتوز وترسم أشكال البللورات فى الجدول التالى :

أشكال البللورات	الإستنتاج
جلوكوسازون فراكتوسازون	
لاكتوسازون مانوسازون	
مالتوسازون	

٤ - إختبار حمض الميوسيك للجلاكتوز Mucic acid for galactose

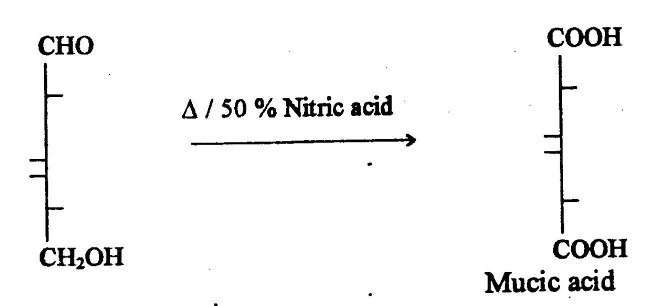
كل السكريات السداسية الألدهيدية تتأكسد بفعل حمض النيتريك ٥٠ ٪ وتعطى حمض ثنائى القاعدية aldaric acids ذائبة فى الماء فيما عدا حمض

جلاكتاريك الغير ذائب فى الماء وتتميز بللورات حمض الميوسيك الغير ذائبة فى الماء الإبرية والتى يمكن تمييزها ميكروسكوبيا كما هو موضح بالشكل التالى والسكريات الثنائية والعديدة التى تحتوى على عدة وحدات جلكتوز تتحلل مائيا بفعل حمض النيتريك وتعطى وحدة جلكتوز حرة وتعطى بذلك نتيجة موجبة مع إختبار حمض الميوسيك .



صورة ميكروسكوبية لبللورات حمض الميوسيك الإبرية

ويجرى هذا الأختبار بوضع حوالى ٥ ملليجرام من سكر الجلاكتوز فى أنبوبة إختبار جافةثم يضاف إليها ١ مل ماء مقطر و ١ مل حمض نيتريك ويسخن المحلول فى حمام مائى يغلى لمدة ساعة وتبرد محتويات الإنبوبة ونترك المحلول طوال الليل وتفحص البللورات المتكونة تحت الميكروسكوب .



ويجرى هذا الإختبار مع الجلوكوز - الجالاكتوز -اللاكتوز وتدون النتائج فى جدول (١١)

جـدول (١١) إختبـار حمـض الميوسيـك

الإستنتاج	المشاهدة	المادة

٥ - إختبار بايل للسكريات الخماسية (تفاعل الأورسينول)

Bial's test (orcinal reaction) for pentones

يميز هذا الإختبار أيضا بين السكريات الخماسية والسداسية ، فتحت تأثير حمض H Cl المركز تنزع ٣ جزيئات من السكرات الخماسية وتعطى مركب الفورفورال والذى يتفاعل مع محلول الأورسينول وكلوريد الحديديك

حيث يحدث تكثيف بينهما ويتكون معقد ذو لون أخضر رائق Clean - green أو أخضر مزرق blue - green أو أزرق . ويسير التفاعل كما يلى :

أما الهكسوزات فإنها تعطى ٥ - هيدروكسى ميثايل فورفورال وذلك يتفاعل مع جوهر كشاف بايل ويعطى محلول ذو لون بنى Brownish وهذا الإختبار أكثر دقة من إختبار الأورسينول الأصلى .

طريقة إجراء الإختبار Procedure

يؤخذ ٥ مل من جوهر كشاف بايل فى إنبوبة إختبار ويضاف إليها ٢ - ٣ مل محلول سكر خماسي ويسخن المحلول برفق حتى تتصاعد أول فقاعة على سطح المحلول مباشرة أو بعد التبريد يصبح المحلول أخضر - أزرق .

ويجرى هذا الإختبار مع السكرات : الجلوكوز - مانوز - أرابينوز - زيلوز - اللاكتوز وتدون النتائج فى جدول (١٢) .

جدول (١٢) نتائج إختبار بايل Orcinol - Hcl reaction

المادة	المشاهدة	الإستنتاج

٦ - White green reaction for pentoses

عند تسخين السكر الخماسى مع حمض الخليك والأنيلين فإنه يتكون مركب ذو لون أحمر زاهى مميز للسكريات الخماسية .

- الجلوكوز والجلاكتوز تعطى لون أخضر
- الفركتوز يعطى لون أصفر باهت
- الجلوكويورونيك يعطى لون أصفر باهت جدا

طريقة العمل Procedure

يوضع ٢ مل محلول سكر خماسى فى أنبوبة إختبار ويضاف إليها ٢ مل حمض خليك ثم ٥ نقط إنيلين معاد تقطيره ، يسخن المحلول للغليان ثم تترك دقيقتين ويبرد يستخلص اللون الناتج بواسطة ٢ مل كلوروفورم . تتكون طبقة الكلوروفورم بلون أحمر زاهى .

٧ - التحليل المائى للسكروز Hydrolysis of Sucrose

السكروز عبارة عن سكر ثنائى غير مختزل وذلك لإرتباط المجموعة الألدهيدية فى الجلوكوز مع المجموعة الكيتونية فى الفراكتوز وبذلك يفقد كل من الجلوكوز والفراكتوز الداخل فى تركيب جزئ السكر صفته الإختزالية وبالتالى يعطى نتائج سالبة فى إختبار الإختزال ولكن عند غليان السكروز مع الاحماض المخففة أو بمعاملته بإنزيم الأنفرتيز Invertase فإنه يتحلل مائيا إلى كميتين متساويتين من الجلوكوز والفراكتوز ويعرف الناتج بإسم السكر المحول Invert Sugar .

كيفية إجراء التجربة :

ضع قليل من محلول السكروز فى أنبوبة إختبار وأضف إليها ٢ - ٥ مل حمض معدنى مخفف (HCl , H_2SO_4 , HNO_3) وتوضع الأنبوبة

فى حمام مائى لمدة نصف ساعة يعادل المحلول بعد ذلك بإضافة محلول الصودا الكاوية أو كربونات الصوديوم نقطة نقطة فى وجود ورقة عباد شمس كدليل .

تؤخذ أجزاء من هذا المحلول المتعادل وتجرى عليها إختبارات فهلنج – بندكت – بارفويد – سلفيانوف وتدون النتائج فى جدول (١٣).

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Sucrose Glucose Fructose

التجربة	قبل التحليل	بعد التحليل	الإستنتاج
فهلنج			
بندكت			
بارفويد			
سلفيانوف			

٨ – التعرف على السكروز فى وجود الجلوكوز

The identification of Sucrose in the presence of glucose

إلى خليط مكون من ٢ مل سكروز ١ ٪ و ٢ مل ١ ٪ جلوكوز ، يضاف ٦ مل جوهر كشاف بندكت ثم يوضع فى حمام مائى يغلى لمدة ١٠ دقائق ثم يبرد ويرشح .

يضاف ٦ مل جوهر كشاف بندكت أخرى وتكرر نفس العملية حتى عدم تكوين راسب (إختزال) . يؤخذ المحلول الناتج (الراشح) بعد إنتهاء الإختزال والتخلص الكامل من الجلوكوز ويضاف عليه حمض Hcl مركز حتى التعادل ثم يضاف زيادة على ذلك نقطتين Hcl مركز ويغلى المحلول لمدة ٣ دقائق ويبرد ، يعادل المحلول بواسطة محلول صودا كاوية ٠,١ ع ثم يضاف إليه ٦ مل محلول بندكت ويسخن فى حمام مائى يغلى .

يلاحظ تكون رواسب ذات لون أحمر طوبى دلاله على وجود سكر غير مختزل تم تحليله بواسطة حمض Hcl .

التمرين العملى الرابع

أمامك مجهول رقم (..) لسكر بسيط أحادى أو ثنائى والمطلوب إجراء الإختبارات اللازمة للتعرف عليها دون نتائجك فى جدول (١٤) .

رقم الزجاجة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

التمـرين العمـلى الخـامـس

السكريات العديدة : Poly Saccharides

أولا : مجموعة النشا

تسمى هذه المجموعة المركبات عديدة التسكر وهى منتشرة فى المملكتين النباتية والحيوانية وتمتاز بكبر حجم الجزئ وبعدم ذوبانها فى الماء ومن أمثلتها النشا بأنواعه المختلفة والجليكوجين والدكسترين وغيرهما .

وتتركب حبيبة النشا من مادتين هما الأميلوبكتين وهو الغلاف الخارجى ويحوى بداخله على الأميلوز . ويكون الأميلوز الجزء الأكبر من حبيبة النشا . وقابل للذوبان نسبيا فى الماء ويعطى لون أزرق مع اليود . بينما الأميلوبكتين لا يذوب فى الماء ولكنه ينتفخ فى الماء الساخن ويتوقف الشكل الميكروسكوبى للنشا على المصدر النباتى فمثلا نشا البطاطس يختلف فى شكله وحجمه عن نشا الأرز والقمح .

تجربة (١) : الفحص الميكروسكوبى :

إفحص ميكروسكوبيا حبيبات النشا من مصادر نباتية مختلفة مثل نشا البطاطس والأرز والذرة بوضعها على شريحة زجاجية وأضف إليها نقطة من الماء وارسم شكلها المميز .

أضف إلى الشريحة وعليها حبيبات النشا نقطة من محلول اليود المخفف ولاحظ أن الحبيبات تأخذ لون أزرق واضح . دون النتائج في الجدول التالي :

جدول (١٥) نتائج الفحص الميكروسكوبي للنشا

نشا أرز	نشا بطاطس
نشا قمح	نشا ذرة

تجربة (٢) : الذوبان :

رج قليل من نشا البطاطس في الماء البارد ولاحظ أن النشا لا يذوب في الماء البارد والدليل على ذلك لو رشح المحلول وأضيف إلى المترشح نقطة من اليود فلا يظهر اللون الأزرق .

أعد هذه التجربة مع الدكسترين التجاري ولاحظ أيضا أن الدكسترين عديم الذوبان في الماء البارد والدليل على ذلك أنه لو رشح المحلول وأضيف إلى المترشح نقطة من اليود فلا يظهر اللون البنفسجي .

ويلاحظ أن كل من النشا والدكسترين تذوب نسبيا في الماء الساخن ويمكن تفسير ذلك على أن التسخين يؤدي إلى إنتفاخ ثم إنفجار طبقة الأميلوبكتين الخارجية وبالتالي إنفراد طبقة الأميلوز على حالة حرة وهي قابلة للذوبان في الماء . لذلك عند الترشيح وإضافة محلول يود مخفف يعطي النشا اللون الأزرق بينما يعطي الدكسترين اللون البنفسجي .

ويستفاد من هذه الظاهرة فى تحضير دليل النشا (عجينة النشا).

تجــربـــة (٣) : تحضيــر عجينـــة النشـــا

ضع فى أنبوبة إختبار ٠,٥ جم نشا ثم يضاف ١٠ ملليلتر ماء وتسخن فى حمام مائى يغلى لمدة ١٠ دقائق مع التقليب المستمر . برد المحلول فتحصل على محلول غروى نصف شفاف هو عجينة النشا المخففة ثم أجرى الإختبارات التالية على عجينة النشا :

أ – **إختبار اليود** :يضاف إلى جزء من عجينة النشا قليلا من محلول اليود (المذاب فى يوديد البوتاسيوم) ولاحظ ظهور اللون الأزرق بوضوح.

ب – **إختبار الترسيب:** أضف إلى حوالى ٢ ملليلتر من عجينة النشا مقدار مساو من محلول كبريتات الأمونيوم أو خلات الرصاص القاعدية مع الرج جيدا لاحظ ترسيب النشا ، ولأثبات ذلك يرشح المحلول ويضاف إلى المترشح نقطة من اليود فلا يتكون اللون الأزرق .

تجــربـــة (٤) : تأثيــر القــلويـــات على النشـــا:

أ – رج قليلا من النشا فى محلول كربونات الصوديوم ولاحظ أن النشا عديم الذوبان فى هذا المحلول .

ب – أعد التجربة بإستخدام أيدروكسيد الصوديوم ولاحظ أن النشا يكون مادة جيلاتينية أضف إلى هذه المادة الجيلاتينية نقطة من اليود ولاحظ عدم ظهور أى لون أزرق .

جـ – أعد هذه التجربة وكون المادة الجيلاتينية ثانية ثم أضف إليها حامض خليك حتى يصبح الوسط حامضى ثم أضف إليها نقطة من محلول

اليود . لاحظ أن لون اليود الأزرق يظهر بوضوح . يلاحظ أنه لابد لظهور اللون الأزرق أن يكون اليود على حالة حرة (لأن إضافة اليود فى وجود الصودا الكاوية يؤدى إلى تكوين هيبويوديد الصوديوم Na OI .

د – إذا سخنت أنبوبة الإختبار التى تحتوى على اللون الأزرق الناتج من إضافة اليود إلى النشا يلاحظ زوال اللون ثم عودته بالتبريد وهذه الظاهرة تحدث فى كل من النشا والدكسترين وإختفاء اللون الأزرق فى حالة التسخين يرجع إلى ما يلى:-

يتكون اللون الأزرق فى حالة النشا نتيجة لإدمصاص اليود على السلسلة المتعرجة للأميلوز حيث كل تعرج عبارة عن ٦ وحدات جلوكوز يدمص بينهم جزئ واحد من اليود وبذلك يظهر اللون الأزرق. وعند تسخين المحلول ذو اللون الأزرق يحدث إستقامة لهذه السلسلة وكذلك إبتعاد اليود عنها فيختفى اللون الأزرق ولكن عند التبريد ترجع ثانية.

هـ – تجرى تجربة ٤،٣ أيضا على الدكسترين وتدون النتائج فى جدول (١٦).

تجـربــة (٥) : تجــارب الإختــزال على النشــا والدكستــرين:

سخن جزء من عجينة النشا مع محلول فهلنج أو بندكت ولاحظ عدم ظهور أى إختزال أعد هذه التجربة مع الدكسترين التجارى ولاحظ وجود إختزال بسيط جدا فى حالة الدكسترين وسبب حدوث الإختزال مع الدكسترين هو أن الدكسترين التجارى يحضر عادة من تأثير حمض الأيدروكلوريك على النشا وهذا قد يسبب تكوين بعض السكريات الأحادية المختزلة.

جـدول (١٦) نتـائج إختبـارات النشـا والدكسـترين

التجربة	النشـا	الدكسـترين
١) الذوبان فى الماء البارد		
٢) الذوبان فى الماء الساخن		
٣) إختبار اليود		
٤) إختبار الترسيب		
٥) تأثير القلويات:		
١- الكربونات		
٢ - التسخين		
٣ - الأيدروكسيد		
٦) تجارب الإختزال:		
أ - فهلنج		
ب - بندكت		

تجـربــة (٦) : التحليل المائى للنشــا والدكستــرين

ضع حوالى ١٠ ملليلتر من عجينة النشا وكذا الدكسترين ثم أضف إليها حوالى ٥ ملليلتر من حمض الأيدروكلوريك المخفف وامزج المحلول جيداً وقسم هذا المزيج إلى خمسة أقسام متساوية فى أنابيب إختبار وضعها كلها فى حمام مائى يغلى فى وقت واحد أخرج الأنابيب من الحمام المائى بعد دقيقة ، ٢ دقيقة، ٥ دقائق ، ١٢ دقيقة ، ٢٠ دقيقة على التوالى مع ملاحظة تبريد الأنبوبة مباشرة بعد إخراجها من الحمام لمائى حتى لا تستمر عملية الإنحلال المائى أكثر من المدة المطلوبة.

قسم محتويات كل إنبوبة إلى قسمين أضف إلى القسم الأول ٥ ملليلتر من الماء ثم نقطة من محلول اليود ولاحظ أن اللون الأزرق يبدأ فى الإختفاء بعد الأنبوبة الأولي تقريبا . أضف إلى القسم الثانى من كل إنبوبة بضع نقط من أيدروكسيد الصوديوم لمعادلة الجموضة ثم محلول فهلنج أو بندكت وسخن للغليان ولاحظ ظهور الإختزال.

دون ملاحظاتك فى الجدول التالى مبينا العلاقة بين ظهور تجارب الإختزال مع إختفاء اللون الأزرق - حيث أن هذه العلاقة تبين سرعة إنحلال النشا .

جـــدول (١٧) التحليل المائي لكل من النشـــا والدكستـــرين

الزمن	النشا		الدكسترين	
	لون اليود	فهلنج	لون اليود	فهلنج
صفر				
١				
٢				
٥				
١٢				
٢٠				

ثـــانيـــا : السليـــولـــوز Cellulose

يوجد السليولوز على حالة نقية فى شعر القطن ، ويكون الهيكل الصلب لجميع النباتات وله أهميـة صناعيـة ، إذ يدخـل فـى صناعـات عديـدة كصناعـة الـورق والحرير الصناعى وبعض أنواع البويات والمواد المتفجرة .

والسليولوز عديم الذوبان فى المذيبات العاديـة ولكنـه سـهل الذوبـان فـى بعـض المحـاليل المركـزة للأمـلاح مثـل كلوريـد الزنبقوز والزنبقيـك وكلوريـد البزموت وغيرها والسليولوز يقـاوم الإنحـلال المـائى بالأحمـاض المعدنيـة مـدة طويلة . وفيما يلى بعض الإختبارات الوصفية التى ستجرى على السليولوز .

تجــربة (١) : تــأثيــر اليــود:

أ - أضف نقطة من محلول اليود علـى قطعـة مـن القطـن أو ورق الترشـيح ولاحظ عدم تلون السليولوز باللون الأزرق.

ب - ضع ٣ نقط من حمض الكبريتيك المركز على ورق الترشيح ثم إغسـلها بسرعة بالماء ثم أضافة نقطة مـن اليـود علـى الجـزء المبلـل بالحـامض فيلاحظ ظهور لون أزرق والسبب فى ذلك يرجع إلى أن السليولوز مـع حمض الكبرتيك المركز يتحول إلى اميلويد يعطى لون أزرق مع اليود.

تجــربـــة (٢) : ذوبان السليولوز :

لا يذوب السليولوز فى الماء ولكنه يذوب فى :-

أ - **محلول شفينترز Schewizer** الذى يحضـر بـإمرار تيـار مـن الهـواء لمدة ساعات فى زجاجة بها أمونيا وخراطة نحـاس فيتكـون أيدروكسـيد نحاسيك شـادرى $Cu(NH_3)_4\ (OH)_2$. وعنـد ذوبـان السـليولوز فـى محلـول شـفينترز يتكـون محلـول شـرابى القـوام يمكـن إعـادة ترسـيب السليولوز فيه بإضافة محلول حمض الخليك .

ب - **محلول بيفان : Bevan** الذى هو عبارة عن حمـض الهيدروكلوريـك المركز مع اليوريا بنسبة ٣ : ١ ويمكن إعادة ترسيب السليولوز فى هذا المحلول بواسطة كحول الإيثايل

تجــربـــة (٣) : التحــليــل المائى للسليولوز :

ضع فى كأس ١٥ ملليلتر حامض كبريتيك (١ : ١) ثم حوالى ٠,٢ جم من ورق الترشيح وحرك المحلول بإستمرار حتى يتكون مزيج متجانس. خفف بالماء إلى أن يصل الحجم الكلى إلى حوالى ١٠٠ ملليلتر وسخنه للغليان لمدة

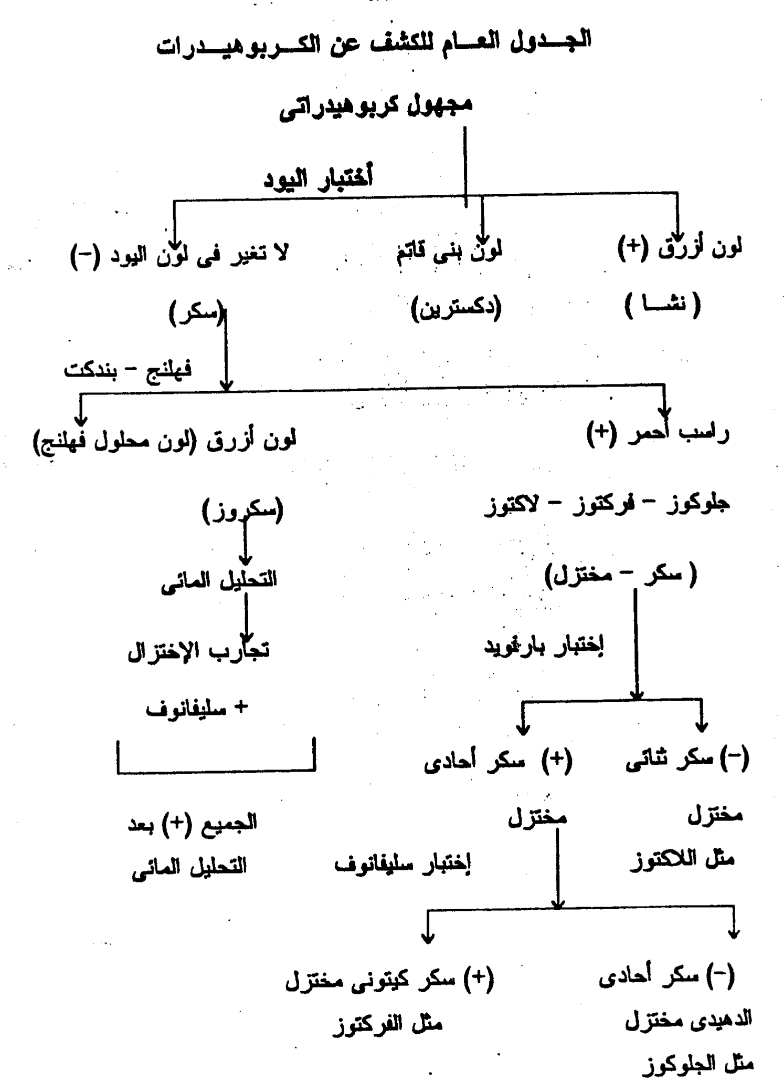
ساعتين. إختبر كل نصف ساعة فى عينة بإختبار اليود والإختزال مع ملاحظة معادلة المحلول بمحلول صودا كاوية وذلك لتتبع إنحلال السيليولوز . دون النتائج فى الجدول التالى موضحا العلاقة بين الزمن ودرجة إنحلال السيليولوز.

جـدول (١٨) الإختبـارات الوصفيـة للسليـولوز

أمامك ورق ترشيح – قطن والمطلوب إجراء الإختبارات الوصفية الخاصة بالسيليولوز عليها .

التجـربة	ورق التـرشيح	القطـن
١) اليود		
٢) حمض كبريتيك + يود		
٣) الدوبان		
أ – محلول بيفان		
ب – محلول شيفيتزر		
٤) التحليل المائى		
٢ دقيقة		
٥ دقيقة		
١٠ دقيقة		
٢٠ دقيقة		
٣٠ دقيقة		

الجـــدول العـــام للكشف عن الكـــربوهيـــدرات



التمــريــن العمــلى الســادس

أمامك مجهول لمادة حيوية كربوهيدراتية والمطلوب إجراء الإختبارات اللازمة للتعرف عليها وتدون النتائج المتحصل عليها فى الجدول التالى (جدول ١٩)

المجهــول رقم (   )

التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

التقــدير الكمـــى للمركبــات الكـــربـــوهيـــدراتيـــة

Quantitative of Carbohydrates

توجد عدة طرق لتقدير المـواد الكربوهيدراتية فـى مصادرهـا الطبيعيـة ويتوقـف إختيار الطريقة المناسبة على المواد الموجودة مع السكر فى مصـادره الطبيعيـة وعلى كمية السكر المطلوب تقديرها ويمكن تقسيم الطرق المتبعة لتقديـر المـواد الكربوهيدراتية إلى الأقسام التالية :

أولا : طرق مبنية على أساس أكسدة السكرات :

أ - الأكسدة بواسطة أيون النحاسيك

وهذه الطرق تعتبر من أكثر الطرق إستعمالا وخاصـة إذا وجد السـكر بكميات كبيرة والتفاعل مبنى على أساس أن السكرات المختزلة تختـزل محلـول فهلنج وبالنسبة للسكرات العديدة أو السكرات الغير مختزلة مثل السكروز فيمكن تقديرها بعد إتمام إنحلالها مائيا إلىمكوناتها الرئيسية من السكرات المختزلـة ثـم يجرى تقدير السكريات المختزلة الناتجة .

$$2\,Cu(OH)_2 + R-CHO \rightarrow R-COOH + Cu_2O\downarrow + H_2O$$

والتفاعل السابق لا يسير بطريقة مكافئ إلى مكافئ Stoichiometric وذلـك نتيجة للتغيرات الكبيرة التـى تحـدث لجزئ السكر عنـد تسـخينه مـع كبريتـات النحاس فى الوسط القلوى (محلول فهلنج) لذلك لابد من الرجـوع إلـى جـداول خاصة تبين ما يكافئ النحاس المختزل من ملليجرامات السـكر وذلـك تبـع لنـوع السكر ومدة التسخين وتركيزها فى المحلول لذلك عند إجراء مثل هذه التقديرات

يجب مراعاة الدقة التامة فى تتبع الخطوات كما جاءت فى الطريقة وخاصة فيما يختص بمدة التسخين .

وبعد تمام الإختزال يقدر أكسيد النحاسوز المتكون عن طريق الوزن Gravimertic أو عن طريقة حجمية Volumetric ثم أستنتاج كمية النحاسيك المختزل .

ب - الأكسدة بواسطة اليود فى الوسط القلوى .

وهذه الطريقة تسير Stoichiometrically وفيها يؤكسد اليود فى الوسط القلوى للسكرات الألدهيدية إلى الأحماض الألدهيدية aldonic acids المناسبة ولا تتأثر السكرات الكيتونية وسنتكلم عن هذه الطريقة بالتفصيل فيما بعد.

ثانيا : طرق لونية Colorimetric

ومعظم هذه الطرق تتلخص فى معاملة السكر بحامض معدنى ذات تركيز معين حيث يتكون هيدروكسى ميثايل فورفورال أو فورفورال على حسب نوع السكر عما إذا كان خماسى أو سداسى ذرات الكربون ويحدث تحليل للسكرات العديدة تحت هذه الظروف إلى سكرات أحادية ثم أيضا تكوين مركبات الفورفورال ويتفاعل المركب الناتج مع مركب، مثل الأنثرون فى طريقة Anthrone - Sulphuric method أو الفينول كما هو فى طريقة Phenol - Sulphuric method فيتكون لون معين يمكن قياسه بجهاز قياس اللون Colorimetric وبالتالى يمكن إستنتاج تركيز السكر . ويفضل إستعمال الطريقة اللونية فى حالة وجود كميات صغيرة من السكر وخاصة بعد فصلها بالتحليل الروماتوجرافى على ورق الترشيح Paper Chromatographic

analysis – وهذه الطريق دقيقة وتستخدم مع جميع المواد الكربوهيدراتية باختلاف أنواعها وتركيزاتها .

بعض الطرق المتبعة فى تقدير بعض السكريات .

١ – تقدير الجلوكوز بواسطة إختزال أيدروكسيد النحاسيك .

توجد طريقتان لتقدير الجلوكوز بواسط فهلنج أو بندكت كما يلى:

١ – يغلى حجم معين من المحلول السكرى مع كمية زائدة من محلول فهلنج أو بندكت تكفى لإختزال السكريات الموجودة وزيادة بحيث يبقى المحلول أزرق اللون . ثم يرشح المحلول ويخفف الراسب الأصفر (Cu_2O) ويوزن ومن وزنه يمكن حساب كمية الجلوكوز فى المحلول من جداول خاصة .

٢ – ينقط المحلول السكرى من سحاحة على الحجم المعين من محلول فهلنج أو بندكت ويغلى حتى يتم الإختزال . أى يزول اللون الأزرق ومنه يمكن حساب كمية الجلوكوز فى المحلول .

طريقة العمل:

١ – إملأ السحاحة بالمحلول السكرى المخفف ثم ثبتها فوق جفنة موضوعة على لهب بنزن .

٢ – ضع فى الجفنة ١٠ ملليلتر من محلول فهلنج (٥ ملليلتر أ + ٥ ملليلتر فهلنج ب) سخن للغليان على لهب منتظم .

٣ – نقط المحلول السكرى من السحاحة علىمحلول فهلنج وهو يغلى تدريجيا لتقل زرقة المحلول تدريجيا حتى يختفى اللون الأزرق تماما – وهذا هو نقطة أنتهاء التفاعل .

٤ – يجب الإحتراس من شدة الغليان خوفا من تناثر جزء من محلول فهلنج خارج الجفنة .

٥ – إذا إضطررت لإضافة جزء من الماء المقطر للمحافظة على حجم المحلول فى الجفنة يجب تسخين الماء أول للغليان وذلك لطرد الأكسجين الذى قد يكون ذائب فيه والذى يساعد على الأكسدة بينما التقدير مبنى على أساس الإختزال.

٦ – لا يمكن مواصلة التقدير إذا إنقطع فهلنج عن الغليان أثناء العمل .

الحســاب :

نفرض أن حجم المحلول السكرى لزم لتمام إختزال محلول فهلنج أو بندكت ١٨ ملليلتر – هذا الحجم يكافئ ٥٠ ملليجرام جلوكوز .

∴ عدد ملليجرامات الجلوكوز فى ١٠٠ ملليلتر = $\frac{٥٠ \times ١٠٠}{١٨}$ = ٢٧٧,٧ مجم

تقدير السكرات المختزلة بطريقة سكورل : Schoorl

وهذه الطريقة مبنية على أساس أكسدة السكرات الممختزلة بواسطة محلول فهلنج ثم تقدير النحاسيك المتبقى بإضافة كمية من يوديد البوتاسيوم فى وسط حامضى فينفرد اليود مكافئا لكمية النحاسيك تبعا للمعادلة التالية:

1 - $2\,CuO + R\,CHO \rightarrow R\,COOH + Cu_2O$

2 - $2\,CuSO_4 + 4\,KI \rightarrow 2\,K_2SO_4 + Cu_2I_2$

$2\,Cu^{++} + 4\,I^- \rightarrow Cu_2I_2 + I_2$

3 - $2\,Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\,NaI$

ويلاحظ فى هذه الطريقة عدة نقاط هامة:-

١ - لابد من وجود كمية زائدة من أملاح النحاسيك وذلك بعد تمام التفاعل وإلا لما إنفرد يود بعد إضافة يوديد البوتاسيوم .

٢ - ضبط اللهب بحيث يبتدأ الغليان فى المدة المحددة إذ أن شدة التسخين أو ضعفه يؤثر على على النتائج .

٣ - إستمرار الغليان للمدة المحددة بالضبط ثم تبريد الدورق بعد ذلك تحت ماء الصنبور لإيقاف التفاعل .

٤ - يلاحظ إضافة كميات كافية من يوديد البوتاسيوم وذلك لتكون نقطة النهاية واضحة وثابتة .

المطلوب تقدير عدد ملليجرامات السكرات المختزلة (مقدرة كجلوكوز) وذلك فى لتر من المحلول الذى أمامك بالإستعمال طريقة سكورل Schoorl لتقدير السكرات المختزلة .

<u>المحاليل المطلوبة :</u>

أ - محلول كبريتات نحاس (فهلنج أ) ويحضر بإذابة ٣٤،٦٤ جم فى الماء ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ سم٣ .

ب - محلول فهلنج (ب) ويحضر بإذابة ١٧٣ جم ملح روشيل و ٥٠ جم من أيدروكسيد الصوديوم فى الماء ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ سم٣ بالماء المقطر .

جـ - محلول يوديد بوتاسيوم ٢٠ ٪

د - محلول حمض كبريتيك ٥ ٪

طريقة العمل

أولا : تجربة البلانك Blank

١) يوخذ ٢٥ سم٣ بالماصة فى الماء المقطر ثم يضاف بالماصة ٢٥ سم٣ من خليط فهلنج أ ، ب .*[١]

٢) سخن المحلول على اللهب بحيث يبدأ الغليان بعد دقيقتين ويستمر فى الغليان لمدة ثلاث دقائق بالضبط .

٣) يبرد الدورق تحت ماء الصنبور حتى درجة حرارة الغرفة .

٤) يضاف ½ أنبوبة إختبار محلول يوديد بوتاسيوم ثم أنبوبة إختبار حمض كبرتيك فينفرد اليود ويترك الدورق لمدة دقيقتين لتمام إنفراد اليود .

٥) يعاير اليود المنفرد بالثيوكبريتات حتى اللون الباهت ثم يضاف ١ سم٣ نشا وتكمل المعايرة حتى اللون الأبيض ويثبت لمدة دقيقتين ، فحجم الثيوكبريتات يكافئ النحاسيك الكلى

ثـــانيـــا : التجـــربـــة أو تقدير النحاسيك المتبقى:

يوخذ ٢٥ سم٣ من محلول السكر ويوضع فى دورق مخروطى ثم يضاف ٢٥ سم٣ من خليط فهلنج أ ، ب وتتبع نفس الخطوات السابقة .

فحجم الثيوكبريتات يكافئ النحاسيك المتبقى بعد الإختزال.

---

*[١] يستحسن إضافة ١٠ سم٣ من فهلنج (أ) ثم إضافة ١٠ سم٣ من فهلنج (ب) ولكن لتسهيل العمل فى المعمل يخلط فهلنج (أ) ، (ب) بكميات متساوية ويأخذ الطالب ٢٥ سم٣ من الخليط .

طـريقـة الحســاب:

حجم الثيوكبريتات المكافئ للنحاسيك الكلى - حجم الثيوكبريتات المكافئ النحاسيك المتبقى بعد الإختزال = حجم الثيوكبريتات المكافئ للنحاسيك المختزل.

حجم الثيوكبريتات المكافئ للنحاسيك المختزل × قوة الثيوكبريتات × ١٠ = حجم الثيوكبريتات $\frac{س}{١٠}$ بالضبط المكافئ للسكر.

ومن جداول خاصة يمكن معرفة ما يكافئ السم٣ الواحد من الثيوكبريتات $\frac{س}{١٠}$ من ملليجرامات السكر.

فإذا كان السم٣ الواحد مثلا من الثيوكبريتات $\frac{س}{١٠}$ يكافئ ٩,١ حجم جلوكوز .

∴ عدد ملليجراملت السكر فى ٢٥ سم٣ من المحلول :

عدد السم٣ من ثيوكبريتات $\frac{س}{١٠}$ بالضبط × ٩,٩ = س جم

مثلا من عدد المللیجرامات فی اللتر = س × ٤٠

تقـدير الجلوكــوز فى وجــود الفركتــوز

عند تقدير الجلوكوز فى وجود الفركتوز لا يمكن إستعمال الطـرق المبنية على إختزال أملاح النحاس فى الوسط القلوى إذ أن كلا من الجلوكوز والفركتوز له تأثير مختزل .

وقد وجد أن اليود فى الوسط القلوى وتحت ظروف معينة يؤكسد السكرات الألدهيدية (جلوكوز) إلى الأحماض الألدونية المناسبة بينما لا تتأثر

السكرات الكيتونية تحت نفس الظروف ومعادلة أكسدة السكرات الألدهيدية باليود تسير تبعا للتفاعل الآتى .

$$1 - I_2 + 2\,NaOH \rightarrow NaOI + NaI + H_2O$$

$$2 - R\text{-}CHO + NaI + NaOH \rightarrow R\text{-}COONa + 2\,NaI + H_2O$$

وبجمع المعادلتين ١ ، ٢ نحصل على المعادلة النهائية :

$$3 - R\text{-}CHO + I_2 + 3\,NaOH \rightarrow R\text{-}COONa + 2\,NaI + 2\,H_2O$$

وبعد إتمام التفاعل أى أكسدة السكر الالدهيدى بواسطة اليود يمكن معرفة اليود المتبقى أى الزائد عن التفاعل وذلك بتحميض المحلول فينفرد اليود الزائد تبعا للمعادلة :

$$4 - NaOI + NaI + H_2SO_4 \rightarrow I_2 + Na_2SO_4 + H_2O$$

ثم يعادل اليود المنفرد بواسطة الثيوكبريتات

$$5 - I_2 + 2\,Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

فالفرق بين اليود الكلى المضاف واليود المتبقى بعد تمام التفاعل يعطى اليود المتفاعل مع السكر الألدهيدى ومنه يمكن إستنتاج كمية السكر على أساس أن جزئ من اليود (٢٥٤ جم) يتفاعل مع جزئ من الجلوكوز (١٨٠ جم) وذلك تبع للمعادلة (٣) ومنه يمكن إستنتاج أن ١ سم٣ من اليود أو ع يكافئ ٩ جم من سكر الجلوكوز و ٧,٥ جم من سكر خماسى الدهيدى (أرابينوز) .

التمـــرين العمـــلى الســـابـــع

المطلوب تقدير عدد جرامات الجلوكوز الموجودة فى اللتر من المخلـول الذى أمامك والمحتوى علىخليط من الجلوكوز والفركتوز.

المحـــاليـــل المطـــلوبـــة:

أ – محلول يود فى يوديد البوتاسيوم قوته ٠,١ س تقريبا.

ب – محلول أيدروكسيد صوديوم قوته ٠,٢ س تقريبا .

حـ – محلول ثيو كبريتات الصوديوم قوته ٠,١ س تقريبا .

خطـــوات العمـــل:

أولا : تجربة البلانك : Blank

وفيها يقدر اليود الكلى وفيها تتبع جميع الخطـوات المتبعـة فـى التجربـة الأصلية بإستثناء محلول السكر الذى يستبدل بالماء :

١ – يؤخـذ بالماصـة ٢٥ سم من الماء وتوضـع فـى دورق مخروطـى ثـم تضاف بالماصة ٢٥ سم من محلول اليود.

٢ – يضاف إلى محتويات الدورق ٢٥ سم٣ بالماصة من محلول أيدروكسيد الصوديوم ويلاحظ الإضافة نقطة فنقطـة مـع التقليـب – يـترك الـدورق بعد ذلك لمدة ١٠ دقائق .

٣ – تحمض محتويات الدورق بكمية زائدة قليلا من الحامض ويستعمل لذلك إنبوبة إختبار حامض كبرتيك تركيزه حوالى ١٠ ٪ فينفـرد بذلـك اليـود الزائد .

٤ - تعاير محتويات الدورق بالثيوكبريتات حتى اللون الأصفر الباهت ثم يضاف ١ سم٣ من دليل النشا وتكمل المعايرة حتى أن نقطة واحدة من الثيوكبريتات تحول اللون من الأزرق إلى عديم اللون .

تؤخذ قراءة السحاحة وحجم الثيوكبريتات هنا يكافئ كمية اليود الكلية المضافة .

ثانيا : تقدير السكر:

يؤخذ ٢٥ سم٣ من محلول السكر في دورق مخروطي وتتبع بعد ذلك نفس الخطوات السابقة من حيث إضافة اليود والصودا إلخ...... حجم الثيوكبريتات هنا يكافئ اليود المتبقي .

طريقة الحساب :

حجم الثيوكبريتات في البلانك - حجم الثيوكبريتات في التجربة = حجم الثيوكبريتات المكافئ لليود المستهلك ،

حجم الثيوكبريتات المكافئ لليود المستهلك × قوة الثيوكبريتات × ١٠ = حجم الثيوكبريتات $\frac{س}{١٠}$ بالضبط

حجم الثيوكبريتات $\frac{١}{١٠}$ بالضبط × ٩ = عدد ملليجرامات السكر في ٢٥ سم٣ من المحلول

عدد ملليجرامات السكر في ٢٥ سم٣ × ٤٠ = عدد الملليجرامات في اللتر .

التمـــريـــن العملى الســـــابع

نتائج التحليل الكمى للكربوهيدرات

الباب الثالث

البروتينات Proteins

تعتبر البروتينات مجموعة من المركبات الحيوية الهامة التى تدخل فى تركيب الأنسجة الحية سواء كانت نباتية أو حيوانية حيث تدخل فى تركيب الأغشية – بروتينات الدم – مثل الهيموجلوبين وبلازما الألبيومين – والألفا والبيتا جلوبيولين – والفيبرينوجين وتدخل فى تركيب الأنزيمات والهرمونات – وكذلك فى اللبن والثمار والبيض والشعر . ويدخل فى تركيب البروتينات عناصر الكربون – والأيدروجين والأكسوجين والنيتروجين بصفة أساسية وكذلك الفوسفور والعناصر الأخرى مثل الماغنسيوم والحديد والكوبالت . وتتكون البروتينات من إرتباط الأحماض الأمينية حيث تمثل هذه الأحماض الوحدة البنائية للبروتينات بالرابطة الببتيدية Peptide linkage وتقسم البروتينات إلى ثلاثة أقسام رئيسية هى :–

١ – *البروتين البسيط : Simple proteins :*

وهى عبارة فقط عن إرتباط الأحماض الأمينية مكونة Polymers عضوية ذات وزن جزيئى عالى ويطلق عليها عديد الببتيد Polypeptides .

٢ –*البروتينات المركبة أو المرتبطة: Conjugated proteins :*

وهى تحتوى زيادة على الأحماض الأمينية مركبات أخرى غير بروتينية تسمى المجموعة الفعالة Prosthetic group مثل الكربوهيدرات والليبيدات والأحماض النووية وغيرها .

٣ - *البروتينات المشتقة : Derived proteins :*

وهى نواتج التحلل المائى للبروتينات ومنها البروتيوزات - الببتونات - وكذلك تغير البروتينات الناتجة من التغير فى الجزئ البروتينى وهذه العملية تسمى Denaturatiun - بروتينات مشتقة ومنها الجيلاتين الناتج من الكولاجين .

الدرس العملى الثامن

التفاعلات الوصفية للمركبات النتروجينية Qualitative tests

تدل الإختبارات الوصفية على وجود بعض الأحماض الأمينية أو مجموعات معينة فى جزئ البروتين .

(١) تفاعل النتهيدرين The ninhydrin reaction

النتهيدرين (ثلاثى كيتوهيدريندين هيدرات) - مادة مؤكسدة - تتفاعل مع جميع الأحماض الأمينية فى pH ما بين ٤ - ٨ وتعطى مركب ذو لون بنفسجى Purple - coloured compound . وهذا التفاعل أيضا يعطى نتيجة موجبة مع الأمونيا والأمينات الأولى ولكن بدون تحرر لثانى أكسيد الكربون . وهذا التفاعل حساس ومثالى للكشف عن الأحماض الأمينية المفصولة كروماتوجرافيا وكذلك لتقديرهم كميا فى الأجزاء المفصولة على الأعمدة Column fractions والأساس العلمى للتفاعل موضح بالمعادلات التالية :

(I)

CO, OH, C, CO, OH + $R-C(NH_2)(H)-COOH$

$\downarrow$

CO, OH, C, CO, H + RCHO + CO_2 + NH_3

Hydrindantin

(ii)

CO, OH, C, CO, H + NH_3 + HO, CO, C, HO, CO

Hydrindantin — Ninhydrin

$\downarrow$

CO, CH-N = C, CO, CO, CO + $3H_2O$

ولإجراء الإختبار يوضع ٢ مل من محلول البروتين المحضر أو مخلوط الأحماض الأمينية ثم يضاف ثلاث نقط من النهيدرين المحضر بإذابته فى

الأسيتون (٩٥ ٪) ويرج المخلوط جيدا ويغلى فى حمام مائى لمدة ٢ دقيقة فيعطى لون بنفسجى واضح .

(٢) إختبار البيوريت Biuret test

هذا التفاعل ينتج مع المركبات المحتوية على الأقل على رابطتين ببتيديتين فعند إضافة كبريتات نحاس (فهلنج أ) إلى محلول قلوى من البروتين أو محلول يحتوى على مركبات بها روابط ببتيدية يتكون لون بنفسجى وشدة اللون تعتمد على عدد هذه الروابط الببتيدية – ينجح هذا الإختبار مع اليوريا بالتسخين لأنه بتسخين اليوريا تعطى مركب البيوريت وهو ينتج كالآتى :

$$2\ NH_2-\overset{\|}{C}(=O)-NH_2 \xrightarrow{\Delta} H_2N-C(=O)-NH-C(=O)NH_2 \rightarrow HN=C(OH)-NH-C(=O)NH_2$$

Biuret

$$\begin{matrix} NH=C(OH)-NH-C(=O)-NH_2 \\ H_2N-C(=O)-NH-C(OH)=NH_2 \end{matrix} \xrightarrow[-\ 4\ H_2O]{2\ NaOH\ ,\ Cu\ (OH)_2} \left[\begin{matrix} HN-C(=O)-HN-C(O^-)=N \\ Cu^{++} \\ N=C(O^-)-NH-C(=O)-NH \end{matrix} \right]^{-2} 2Na^+$$

المركب ذو اللون البنفسجى

– لا يعطى إختبار البيوريت نتيجة موجبة مع الأحماض الأمينية الموجودة على صورة حرة أو مخلوط طبيعى منها ماعدا الحمض الأمينى هستيدين فيعطى

نتيجة موجبة وهذا يرجع إلى إعطاءه مركب البيوريت بالتسخيى وهذا الإختبار يعتبر وصف عام للروابط الببتيدية أو للبروتينات المحتوية على أكثر من رابطة ببتيدية حيث لا ينجح مع الـ Dipeptides لأنها تحتوى على رابطة ببتيدية واحدة .

ويجرى الإختبار بإضافة ٢ مل من محلول بروتين فى أنبوبة ثم يضاف إليها ٤مل من ص أ يد ١٠ ٪ ثم الرج جيدا ثم التسخين والتبريد ثم يضاف إليها ١ - ٢ نقطة من كبريتات النحاسيك ١ ٪ ثم الرج حيدا فيتكوت لون بنفسجي أو بنفسجى محمر أو لون أحمر وهذا يرجع إلى عدد الروابط الببتيدية بجزئ البروتين أو بمعنى أخر إلى الوزن الجزيئى للبروتين فكلما زاد الوزن الجزيئى للبروتين كلما إحتوى البروتين على عدد كبير من الروابط الببتيدية وبذلك يعطى لون بنفسجى محمر وعند الوزن الجزيئى الصغير يعطى لون أحمر وهذا واضح جدا مع الببتونات .

(٣) إختبار الزانثوبروتيك The Xanthoproteic reaction

ينجح هذا الإختبار مع الأحماض الأمينية التى تحتوى على نواه عطرية فيعطى لون أصفر وأملاح المشتقات الناتجة تعطى لون برتقالى وتستجيب لهذا الإختبار حامض التيروزين والتربتوفان وفينايل الأنين .

طريقة إجراء الإختبار

يوخذ ٢مل محلول بروتين ويضاف إليها ٢ مل حمض نيتريك مركز ثم التسخين فى حمام يغلى - برد المخلوط ثم أضف بضع نقط من هيدروكسيد الصوديوم . يلاحظ تلون المحلول باللون الأصفر ثم يتحول إلى اللون الرتقانى اللامع . ويمكن تفسير معادلات التفاعل كما يلى:

$$HO-C_6H_4-CH_2-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H}{N}-R_2 + HNO_3 \longrightarrow$$

بروتين به حمض أمينى عطرى (تيروزين)

$$O=C_6H_3(N(=O)-OH)-CH_2-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_2 \rightleftarrows HO-C_6H_4-CH_2-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_2$$

NH_4OH

مركب ذو لون أصفر

$$O=C_6H_3(N(=O)-O^-)-CH_2-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_2 + H_2O$$

(٤) إختبار ميلون Millon's test

يوخذ ٣ مل محلول بروتين فى أنبوبة إختبار ثم يضاف واحد ملليلتر من محلول ميلون (عبارة عن نترات زئبقيك ونتريت الزئبقيك وحامض نيتريك

وحمض نتروز) فيتكون راسب أبيض أولا ثم بالتسخين يتحول إلى راسب أحمر غامق ونجاح هذا الإختبار يدل على إحتواء البروتين على حمض أمينى تيروزين وسبب تكون الراسب الأبيض هو الترسيب الغير عكسى بحامض النيتريك المركز وأما تكوين اللون الأحمر فيمكن تفسيره حسب المعادلات الأتية:

$$HO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH + Hg^{+2} + HNO_3 + HgNO_2 \longrightarrow HgO-C_6H_3(NO_2)-CH_2-CH(NH_2)-CO$$

تيروزين

نتروز تيروزين الزئبقيك (المركب ذو اللون الأحمر)

وهذا الإختبار مميز للأحماض الأمينية التى تحتوى على هيدروكسيل بنزين التى تتفاعل مع جوهر ميلون معطية اللون الأحمر .

(٥) إختبار فوليا :

إختبار مميز للكبريت فى حالة السستئين و السستين (Cysteine - Cystine)

المواد المطلوبة :

١ - Na OH ٠,١ N
٢ - خلات رصاص (٠,١ مولر)
٣ - بلمات الرصاص تحضر مباشرة قبل الإستعمال بإضافة ٥ سم (١) إلى ٢ سم من (٢) ويغلى حتى يذوب الراسب الأبيض .
٤ - حمض أمينى كبريتى (٠,١ ٪ سستئين - سستين - ميثونين)
٥ - Na OH (١٠ ٪)

الطريقة

يغلى ٢ سم محلول أمينى مع ٠,٥ سم Na OH (١٠٪) لمدة دقيقتين برد ثم أضف نصف سم محلول خلات الصوديوم .

ينجح هذا الإختبار مع رابطة ثنائى الكبريت فى السستين (وهى رابطة ضعيفة) ولا يعطى نتيجة موجبة مع حمض أمينى الميثونين رغم إحتوائه على الكبريت وذلك لوجوده فى صورة مرتبطة إرتباط قوى .

وفكرة الإختبار تتلخص فى أنه عند تسخين محلول البروتين المحتوى على السستين فى وسط قلوى مع Na_2PbO_2 يعطى لون أسود من كبريتوز الرصاص .

$$HOOC-CH(NH_2)-CH_2-SH + 2\,NaOH \xrightarrow{\Delta} HOOC-CH(NH_2)-CH_2-OH + Na_2S + H_2O$$

$$2\,Na_2S + Na_2PbO_2 + H_2O \longrightarrow PbS \downarrow + 4\,NaOH$$

وعلى حسب كمية الحامض الأمينى سستين يتكون الراسب وتحدد كميته .

كيفية تحضير محلول فوليا :

$$(CH_3 - COO)_2Pb + 2NaOH \rightarrow 2CH_3 - COO\,Na + Pb(OH)_2 \downarrow NaOH$$

$$6\,Pb(OH)_2 + 2\,NaOH \rightarrow Na\,PbO_2 + 2\,H2O + NaOH$$

بالإضافة ٥ سم NaOH ٠,١ ع إلى ٢ سم خلات رصاص أو مولر ثم يغلى حتى يذوب الراسب الأبيض .

٦ - إختبار سكاجوش : مميز لحمض أمينى أرجنين (مجموعة جوانيدين)

بإضافة محلول ألفانافثول وماء البروم إلى محلول البروتين يظهر لون أحمر مميز لمجموعة الجوانيدين فى الأرجنين واللون الأحمر نتيجة تكثف الألفانافثول مع الأرجنين أما فعل ماء البروم هنا كمادة مؤكسدة وربما يدخل فى التفاعلات الوسطية .

NH_2 – C(=NH) – NH – CH_2 – CH_2 – CH_2 – CH(NH_2) – COOH + (ألفانافثول، OH) + 3 Na OBr → (نافثالين – O – N – O – نافثالين) – C(=NH) – NH – CH_2 – CH_2 – CH_2 – CH(NH_2) – HOOC + 2 NaBr + NaOH + 2 H_2O

ناتج تكثيف الأرجنين مع الألفانافثول

المواد المطلوبة

١ - حامض أمينى (٠,١ ٪ جليسين - أرجنين) ، يوريا (٠,١ ٪)

٢ - يوريا (٠,١ ٪) ٣ - جوانيدنيات (٠,١ ٪ كرباتين - فينايل جوانيدين)

٤ - NaOH ٤٠ ٪ ٥ - ألفانافثول (١ ٪ فى الكحول)

٦ - ماء بروم (يوضع نقطتين البروم فى ١٠٠ سم ماء) .

الطريقة :-

يخلط ١ سم قلوى قوى مع ٣ سم حمض أمينى ثـم أضـف ٢ نقطـة مـن محلول ألفانافثول يرج جيـدا ثم يضـاف ٤ - ٥ نقط مـن مـاء الـبروم - لاحـظ اللون المتكون .

هذا الإختبار ليس مميزا فقط للراجنين ولكنه ممكن أن ينجح مع مركبات الجوانيدين مثل :

Glycocyamine	Methyl guanidin	Creatine	Urea
$H_2N-C(=NH)-NH-CH_2-COOH$	$H_2N-C(=NH)-NH-CH_3$	$H_2N-C(=NH)-N(CH_3)-CH_2-COOH$	$H_2N-C(=O)-NH_2$

الطريقة :

إلى ١سم محلول بروتين أضف ١سم محلول سكاجوش + نصف سم محلول ألفانافثول كحولي ثم نصف سم محلول البروم يعطى لون أحمر وزيادة البروم تمنع ظهور اللون .

٧ - إختبار الدى أزو Pauly's test

إختبار Pauly مميز للفينولات - الأميدازول - البرولين - ثيازول ويسمى إختبار بولى . يتم الإختبار بإضافة محلول ثنائى الأزو إلى محلول بروتين فى وسط قلوى فيظهر لون برتقالى .

يرتبط حامض Diazotized sulphanic مع الأمينات - الفينولات - الأميدازولات ليعطى مركبات أزو ملونة وتتكون المركبات Diazonium على البارد فقط ولذلك يجب تبريد المحلول فى الثلج قبل عملية Diazotization.

(i)

$$H_2N-C_6H_4-SO_3H + HNO_2 + HCl \longrightarrow \bar{Cl}\overset{+}{N_2}-C_6H_4-SO_3H + 2H_2O$$

Sulphanilic acid — Diazonium compound

(ii)

$$HO-C_6H_4-CH_2CH(NH_2)COOH + \bar{Cl}\overset{+}{N_2}-C_6H_4-SO_3H \longrightarrow HO-C_6H_3(CH_2CH(NH_2)COOH)-N=N-C_6H_4-SO_3H + HCl$$

Tyrosine — Diazonium compound — Azo dye + HCl

المواد المطلوبة :

١ - أحماض أمينية (٠,١ ٪ جليسين - تيروزين - هستدين - تربتوفان) .
٢ - حامض سلفانيليك (١ ٪ فى ١٠ ٪ يدكل) .
٣ - نيتريت صوديوم (٥ ٪) ٤ - كربونات صوديوم (١ ٪)

الطريقة :

يخلط ١ سم حامض سلفانيليك مع ٢ سم محلو حامض أمينى - يبرد المخلوط فى حمام ثلجى - يضاف ١ سم نيتريت صوديوم ويترك المحلول ليبْرد فى الثلج لمدة ٣ دقائق - يجعل المحلول قلوى بإضافة ٢ سم كربونات صوديوم ولاحظ اللون المتكون .

يحضر محلول الداى أزو بإضافة ٣ سم ١ ٪ محلول حمض السلفونيك فى $HCCL_3$ ٢ ٪ ثم يضاف ٣ سم محلول ٥ ٪ نتريت صوديوم ثم يرج جيدا . يضاف إلى ١ سم محلول بروتين ١ سم محلول كربونات صوديوم ١٠ ٪ ثم ١سم من الجوهر الكشاف فيظهر لون أحمر وإذا ظهر اللون أصفر دل على زيادة كمية التيروزين .

٨ - إختبار الهوبكنزكول Hopkin's Cole مميز لمجموعة الأندول

يميز التربتوفان لإحتوائه على الأندول حيث تكثيف بين جزيئين أندول مع جزيئ حمض جليكوكساليك مكون معقد وبإضافة حمض كبرتيك على جدار الإنبوبة تتكون حلقة قرمزية .

$$\text{Tryptophan (H)} + \text{OHC-COOH} \xrightarrow[-H_2O]{H_2SO_4} \text{(indolyl-}CH_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH)}_2\text{CH-COOH}$$

المواد المطلوبة:

١ - أحماض أمينية (٠,١ ٪ جليسين - تيروزين - تربتوفان) .

٢ - حامض خليك ثلجى عرض للضوء ٣ - حامض كبرتيك مركز

الطريقة:

إلى ١ سم محلول بروتين أضف ١مل محلول جليوكسالسك ١ ٪ مع الرج ثم أضف بإحتراس على جدار الأنبوبة حامض كبرتيك مركز فتظهر حلقة قرمزية

- يحضر حمض الجليوكساليك بتعريض كمية من حمض الخليك الثلجى للضوء فيتحول كمية منه إلى حامض جليوكساليك .

٩ - إختبار نتروبروسيد الصوديوم :

مميز لمجموعة ثيول (SH-) والمثيونين

عند تسخين البروتين مع القلوى يتكون كبرتيد الصوديوم الذى يكون مع نتروبروسيد الصوديوم معقد له لون أحمر

الطريقة :

١سم محلول بروتين يضاف إليه ١سم NaOH ١٠ ٪ ثم التسخين لمدة دقيقة وبعد التبريد يضاف نصف سم محلول نتروبروسيد الصوديوم حديث التحضير فيظهر اللون الأحمر .

١٠ - إختبار الروزنهيم : مميز لمجموعة الأندول

محلول الروزنهيم عبارة عن محلول كلوريد حديديك مع فورمالدهيد .

الطريقة : يؤخذ ١ سم محلول بروتين ويضاف إليها ١ سم محلول الروزنهيم وترج جيدا ثم يضاف بإحتراس على جدار الأنبوبة حمض كبرتيك مركز تظهر حلقة قرمزية على سطح الإنفصال مميزة كمجموعة الأندول .

١١ - إختبار موليش : Molisch Test

يعطى هذا الإختبار نتيجة موجبة مع البروتينات المحتوية على جزء كربوهيدراتى وتسمى بالجليكوبروتينات .

ويجرى الإختبار بإضافة ٣ - ٥ نقط محلول الألفانفثول إلى ٣ ملليلتر من محلول البروتين ثم يضاف ٢ ملليلتر حمض كبرتيك مركز نقطة نقطة على جدار الإنبوبة الداخلى فإذا ظهرت حلقة بنفسيجية عند سطح إلتقاء السائلين دل على وجود جزئ كربوهيدراتى مرتبط مع الجزئ البروتينى .

والجدول التالى يجمل التفاعلات اللونية السابقة للبروتينات

الإختبار	اللون	المجاميع الفعالة	الإحماض التى تعطى الإختبار
النهيدرين	بنفسجى	أحماض أمينية - أمونيا	جميع الأحماض الأمينية
البيوريت	بنفسجى أو قرمزى	روابط ببتيدية	ـــــــ
الزانثوبروتين	أصفر - برتقالى	حلقة بنزينية	تيروزين - فينايل الأنين
بولى	برتقالى	فينول- الأميدازول -ثيازول - بروتين	تيروزين - برولين
ميليون	أحمر	فينول	تيروزين
هوبكنز - كول	أرجوانى	تربتوفان	تربتوفان
سكاجوتس	أحمر	الأرجنين	الأرجنين
الكبريت	بنى قاتم	مجموعة كبريت	سيستين وستئائين
نتروبروسيد	أحمر بنفسجى	مجموعة سلفوهيدريل	ستئائين
موليش	بنفسجى	مجموعة كربوهيدراتية	
الروزنهيم	حلقة قرمزية	مجموعة الأندول	تربتوفان

أمامك ثلاثة مواد بروتينية والمطلوب إجراء إختبارات التلوين السابقة وتدون النتائج فى الجدول التالى (جدول ٢٠)

المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

الدرس العملى التاسع

إختبار الخثور والترسيب

Coagulation and precipitation tests

البروتينات كما ذكرنا مركبات ذات وزن جزيئى عالى ولذلك فعند ذوبانها فى الماء فإنها تعطى محاليل غروية ذات لزوجة مرتفعة لا تنفذ من الأغشية شبه المنفذة والبروتينات الذائبة منها فى الماء تكون محبة للماء

والبروتينات فى محاليلها مركبات ذات شحنات كهربائية Hydrophilic تتوقف نوعها على حسب الوسط الموجودة فيها أى أنها أمفوتيرية وذلك نظراً لإحتواء البروتين على المجموعات الحمضية والقلوية .

ويتغير التركيب المميز للبروتينات أما كلية أو جزئيا بفعل الأحماض والقلويات المركزة أو الكحول أو الأسيتون أو التسخين بالأشعة المختلفة ولذلك تكون جزئ مخالف فى تركيبه نتيجة تغير وتكسير الروابط الكيميائية المختلفة داخل الجزئ وبالتالى تختلف خواصه الطبيعية والكيميائية ويعرف بالبروتين المتغير Denaturated أما البروتين الأصلى فيعرف بالبروتين الطبيعى Native.

وتجمع البروتين وتحوله من الحالة الذائبة إلى الحالة الغير ذائبة يتم إما بالتسخين أو بواسطة الأحماض وفى هذه الحالة فإن البروتين لا يمكن إعادة ذوبانه مرة أخرى وتسمى هذه العملية بالتخثر Coagulation وذلك مثل تخثر بروتينات البيض (البيومين وجلوبيولين) بالحرارة وتخثر الكازين الخاص باللبن بإضافة الأحماض المخففة . أما عملية ترسيب البروتينات Precipitation بواسطة أملاح المعادن الثقيلة مثل نترات الفضة أو خلات الرصاص أو بواسطة مرسبات القلويدات مثل حامض التانيك Tannic acid وحامض الفوسفوتنجستك Phosphtungustic أو بإضافة تركيزات مختلفة من كبريتات الأمونيوم أو كبريتات الصوديوم أو بواسطة كحول الأيثايل – فإنه يمكن إعادة ذوبانها مرة أخرى حيث لايحدث للبروتينات أى تغير فى تركيبها البنائى المميز.

وممكن إلقاء مزيدا من الضوء على ترسيب وتخثر البروتين من خلال التجارب التالية :

أ – ترسيب البروتين بالتسخين:

تتجمع كل البروتينات تقريبا بالتسخين فى وسط متعادل أو حامضى ضعيف ولا يتجمع البروتين فى الوسط الحامضى أو القلوى القوى بإستخدام التسخين ولكن بإضافة كمية كافية من الملح المتعادل Na Cl يحدث ترسيب . وثبات البروتين فى محاليله يعتمد على الشحنات الموجبة فى حالة الوسط الحامضى والشحنات السالبة فى حالة الوسط القلوى القوى والتى تتواجد على سطح الجزئ.

```
     H                      H                      H
   ⊕|      OH             ⊕|      O⁻               |      O⁻
H—N—H      |           H—N—H      |           H—N       |
    \      C=O             \      C=O             \     C=O
     \    /                 \    /                 \   /
      C                      C                      C
     / \                    / \                    / \
    R   H                  R   H                  R   H
```

pH 2 - 3 موجب   pH 4 - 9 متعادل   pH 9 - 10 سالب

ويحدث الترسيب السريع والكامل للبروتين من محاليله عند نقطة التعادل الكهربى وتبعا لذلك فإن العامل المحدد لهذا الترسيب (بالتسخين) هو تركيز أيون الهيدروجين فى محاليل البروتين وكذلك تركيز الملح المتعادل .

المحاليل المطلوبة:

١ – محلول ألبيومين البيض مائى فقط
٢ – حمض خليك ١ ٪
٣ – $Na\,OH$ ١٠ ٪
٤ – محلول مشبع من $NaCl$

طريقة إجراء التفاعل:-

١ – يوضع ١ مل محلول بروتين فى خمسة أنابيب إختبار.

٢ – تسخن الأولى للغليان والثانية يضاف إليها نقطتين حمض خليك (وسط حامضى مخفف) والثانية ١ مل حمض خليك (وسط حامض مركز) والرابعة ½ مل $NaCl$ (ملح) والخامسة ١مل $NaOH$ (قلوى قوى).

٣ – تسخن الأنابيب للغليان ونلاحظ راسب كثير فى حالة الأنبوبة الرابعة وراسب أقل فى الأولى والثانية وأما الثالثة والخامسة فلا يحدث ترسيب لماذا ؟

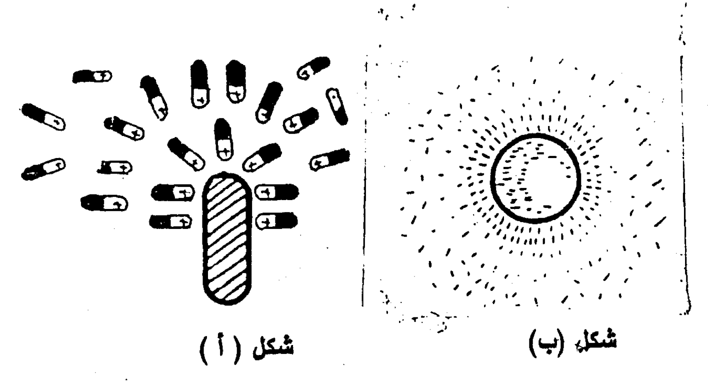
ب -الترسيب بالتمليح على البارد :

الأملاح المتعادلة مثل $Na\,Cl$ وكذلك $(NH_4)_2\,SO_4$ تستخدم فى ترسيب البرويتنات فى محاليلها ترسيبا رجعيا حيث يحدث لجزئ البروتين تجفيف جزئى بالإضافة لتعادل الشحنات على سطح الجزئ ويختلف تركيز الملح تبعا لنوع البروتين الذائب وتستخدم عدة طرق لتفريد أنواع البروتينات وعلى سبيل المثال يرسب الجلوبيولين من محلوله مع الألبيومين بواسطة محلول نصف مشبع من كبريتات الأمونيوم أما الألبيومين فيرسب بمحلول مشبع من ملح الكبريتات السابق والشكل (أ) يبين معادلة الشحنة السالبة للبروتين . والشكل (ب) تخفف الغلاف الفردى حول البروتين بالملح ويجب ملاحظة أن

الجزيئات القريبه من البروتين مرتبه أما البعيدة فغير مرتبة وتترتب الجزيئات الأيونية والكاتيونية حسب قدرتها على الترسيب كما يلى :-

Anions : $SO_4^{=} > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^- > CNS^-$

Cations : $Ca^{++} > Li^+ > Na_+ > K^+ > Rh^+$



شكل (أ)　　　شكل (ب)

والترسيب بالأملاح ترسيب عكسى حيث يمكن إذابة البروتين مرة أخرى لتخفيف تركيز الملح فى المحلول وبالترسيب العكسى يحتفظ جزئ البروتين تقريبا بكل خواصه من أمثلة ذلك الخواص التثبيطية للإنزيمات وغيرها .

المحاليل المطلوبة

١ - محلول بروتين مذاب فى Na Cl (بيض)

٢ - Na Cl صلب .

٣ - محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم

٤ – كبريتات أمونيوم صلبة
٥ – حمض خليك ١ ٪
٦ – Na OH ١٠ ٪
٧ – كبريتات نحاس ١ ٪

طريقة إجراء التفاعل:

١ – الترسيب بواسطة Na Cl صلب:

أضف إلى ١مل محلول بروتين Na Cl صلب حتى التشبع وأترك المحلول تجد أنه بعد عدة دقائق يرسب الجلوبيولين ثم يؤخذ الراشح وإضافة ١مل حمض خليك (وسط حامضى) يظهر بعد مدة راسب الألبيومين يمكن التأكد من عدم وجود بروتين فى المحلول بإختبار البيوريت .

٢ – الترسيب بواسطة $(NH_4)_2 SO_4$

أضف إلى ١مل محلول بروتين ١مل كبريتات أمونيوم مشبعة (المحلول الناتج نصف مشبع) يرسب الجلوبيولين بعد مدة ثم الترشيح فيتبقى الألبيومين فى المحلول يضاف إليه كمية من كبريتات الأمونيوم الصلبةحتى التشبع فيرسب الألبيومين ويمكن الكشف عن تمام الترسيب بإختبار البيوريت .

جـ – الترسيب بأملاح المعادن الثقيلة :

الترسيب هنا ترسيب كاتيونى يختلف هذا النوع عن النوع السابق فى أن تركيز الملح هنا أقل منه فى النوع السابق كما أن الترسيب هنا ترسيب غير عكسى حيث يحدث لجزئ البروتين عند إضافة أملاح المعادن الثقيلة (رصاص – نحاس – فضة – زئبق وغيرها) ولكنه لا يذوب فى الماء حيث أن جزئ البروتين حدث له Denaturation ويتم الترسيب بإرتباط أيون المعدن

فى صورة غير ذائبة مع جزئ البروتين بسرعة حيث يحدث تغير فى التركيب الطبيعى للبروتين.

عند pH = 7 أو أعلى من ذلك يحمل البروتين عادة شحنة سالبة – والمعادن المحملة بشحنة موجبة تعادل شحنة البروتين وبالتالى يخرج البروتين من المحلول – والترسيب بواسطة المعادن الثقيلة يكون أوضح ما يمكن عند أرقام التعادل أو القلوية الخفيفة مع الـ pH ومع ذلك يجب الإحتراس من أن يكون الوسط قلويا حيث أن ترسيب المعادن على صورة أيدروكسيد .

وراسب البروتين يذوب بوضوح فى زيادة من محلول العنصر الثقيل حيث أن زيادة الشحنة تكسب الجزيئات صفة الثبات .

المحاليل المطلوبة :

١ – محلول بروتين (بيض)   ٢ – كبريتات نحاس ١٠ ٪

٣ – خلات رصاص ٥ ٪

طريقة إجراء التفاعل:

١ – ترسيب كبريتات النحاس

يضاف إلى ١ سم محلول بروتين نقطتين كبريتات نحاس ١٠ ٪ فيتكون راسب أزرق مبيض لا يذوب فى الماء . أما إذا أضيف لأنبوبة أخرى بدلا من الماء كبريتات نحاس نجد أن راسب البروتين يذوب مرة أخرى .

٢ – الترسيب بخلات الرصاص :

يضاف إلى ١ سم محلول بروتين ١ سم خلات رصاص ٥ ٪ يتكون راسب لا يذوب فى الماء ولكنه يذوب فى زيادة من محلول الملح .

د – الترسيب بالأحماض المعدنية المركزة

ترسيب البروتين غير رجعى يحدث هنا الترسيب لتغير طريقة تركيب البروتين فيرتبط أنيون الحامض مع جزئ البروتين مكونا معقد ملحى . يستخدم تفاعل البروتين مع حامض النيتريك المركز للكشف عن البروتين فى البول . ويعرف هذا الإختبار بحلقة هيلر .

المحاليل المطلوبة :

١ – محلول بروتين ٥ ٪   ٢ – Na Cl ١٠ ٪

٣ – حامض كبرتيك مركز

١ – ١ سم٣ محلول بروتين أضف إليه بإحتراس وعلى جدار الإنبوبة حمض نيتريك مركز تتكون حلقة من راسب أبيض عند سطح الإنفصال تسمى حلقة هيلر .

٢ – يمكن إستخدام حمض الكبرتيك بدلا من النيتريك ولكن الراسب يذوب فى زيادة من الحامض .

و – الترسيب بالمذيبات العضوية :

يتم الترسيب نتيجة حدوث تخفيف لجزئ البروتين بواسطة الكحول أو الأسيتون حيث لها القدرة على إمتصاص جزيئات الماء ويجب أن يكون وسط التفاعل متعادل أو حمضى ضعيف وليس قلويا ويكون الترسيب كامل إذا أضيف كمية بسيطة من الملح Na Cl لمعادلة شحنات جزئ البروتين والترسيب هنا عكسى إذا حدث إسترجاع للبروتين بعد مدة بسيطة أما إذا كان مدة التأثير طويلة يصبح المترسب غير عكسى .

مواد التفاعل : ١ – محلول بروتين   ٢ – Na Cl ١٠ ٪

٣ – أسيتون   ٤ – كحول إيثايل

طريقة التفاعل:

إلى ١ سم محلول بروتين أضف ٢ سم كحول أو أسيتون يظهر راسب ولكن بإضافه نقطة من Na Cl يحدث ترسيب كبير .

جدول (٢١) إختبارات التخثر والترسيب

أمامك محاليل بروتينية لكل من – البيومين – زلال البيض – كازين اللبن – جيلاتين – المطلوب إجراء إختبارات التخثر والترسيب وتدوين النتائج فى الجدول التالى:

المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

الــدرس العمــلــى العــاشــر

الجــدول العــام للتعــرف علــى المــواد البــروتينيــة

أ - **الذوبان :** فى الماء البارد (البيومين - جلوبيولين - بيتون) فـى المـاء الساخن (جيلاتين) أو محلول مخفف من أيدروكسيد الصوديوم (كازين).

ب - **الإختبارات الكيميائية :**

١ - البيوريت

لون بنفسجى أو وردى (مادة بروتينية)

٢ - إختبار التخثر بالحرارة

لا تكون خثرة

- **كازين** يعطى كل إختبارات التلوين موجبة ماعدا الكبريت
- **جيلاتين** يعطى كل إختبارات التلوين سالبة
- **بيتون** يعطى كل إختبارات التلوين موجبة

تتكون خثرة

(البيومين - جلوبيولين) يعطى نتيجة موجبة مع كل إختبـــارات التلويـــن

جدول (٢٢) : أمامك مادة حيوية والمطلوب إجـراء الإختبـارات اللازمـة عليهـا وتدون نتائجك فى الجدول التالى :

التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

التقديرات الكمية للأحماض الأمينية بالتفاعلات الكيميائية

يمكن تقدير الأحماض الأمينية فـى المحلـول النـاتج بعـد عمليـة التحليـل للبروتين وذلك بعدة طرق يتوقف بعضها على تقدير المجموعات الأمينية الحـرة وفيمايلى بعض هذه الطرق :-

١ - طريقة فان سليك بإستعمال حامض النتروز Van Slyk method

تتفاعل الأحماض الأمينية مع حمض النيتروز مكونه مركبـات Diazo (R - HN - NO) غير ثابتة سريعا تتحول إلى $R-OH + H_2O + N_2$

$$\begin{array}{l} H_2N \\ \quad \backslash \\ \quad HC-R \\ \quad / \\ HOOC \end{array} + ON-OH \longrightarrow \begin{array}{l} HO \\ \quad \backslash \\ \quad HC-R \\ \quad / \\ HOOC \end{array} + N_2 \uparrow + H_2O$$

ويقدر النتروجين الناتج مـع العلم بـأن كميتـه تكـون ضعـف نـتروجين الحمـض الأمينى كما هو واضح من المعادلة وهذا التفـاعل مبنـى عليـه تقدير الأحمـاض الأمينية بطريقة Van Slyk وفيها يضاف إلى محلول الحمض الأمينى مخلوط من ٣٠ ٪ نتريت صوديوم وحمض خليك ثلجى ويرج بشدة لمـدة خمس دقـائق فى جهاز خاص ويعالج غاز الأزوت (N_2) المتصـاعد بمحلـول قلـوى مـن البرمنجنات لإمتصاص أكسيد الأزوت النـاتج كحـاصل عـرض ثـم يقـاس كميـة الأزوت بالمانوميتر .

٢ - تكثيف الفورمالدهيد: Formal titration

وفى هذا التقدير تعاير مجموعات الكربوكسيل للأحمـاض الأمينيـة بعـد إبطال تأثير المجاميع الأمينية . ويجرى ذلك بإضافة الفورمالدهيد المتعادل حيث يتحد مع مجموعة الأمين ويعطيها مجموعـة ميثيلـين Methylene (الخاصـة بمجموعة الأمين) ثم بعد ذلك تجرى المعايرة بمحلول قلوى قياسى .

$$A.A - NH_2 + H - \overset{\overset{\displaystyle O}{||}}{C} - H \longrightarrow A.A - NH - CH_2OH$$

$$A.A - NH - CH_2OH + H - \overset{\overset{\displaystyle O}{||}}{C} - H \longrightarrow A.A - N \begin{matrix} / CH_2OH \\ \backslash CH_2OH \end{matrix}$$

(ثنائي ميثيلول) Dimethylol

وهذا التفاعل هو الأساس المبنى عليه تقدير الأحماض الأمينية بطريقة سورنسن.

التمرين العملى:

قدر عدد ملليجرامات النتروجين الأمينى الموجود فى لتر من محلول الأحماض الأمينية الذى أمامك بطريقة سورنسن Sorenson .

خطواط العمل :

١) يؤخذ ٢٥ ملليلتر من محلول الأحماض الأمينية ويضاف إلى ٥ ملليلتر من محلول الفورمالدهيد المتعادل (تعادل الحموضة الموجودة فى الفورمالدهيد قبل إستعماله بمعايرتها بواسطة القلوى المستعمل فى التقدير ويخصم هذا الحجم من حجم القلوى المستعمل فى معايرة الأحماض الأمينية) .

٢) يرج المحلول جيدا ثم يضاف ١ ملليلتر من دليل الفينولفثالين ويجرى التعادل بواسطة محلول الصودا الكاوية المخففة (٠,٠١ ع) حتى

نحصل على لون وردى خفيف واضح وثابت لمدة دقيقة ولا يضيع اللون بالرج .

طريقة الحساب

ملليمكافئات الصودا الكاوية = عدد ملليمكافئات النتروجين

$$\text{عدد ملليجرامات النتروجين الأمينى فى اللتر} = \frac{\text{عدد ملليمكافئات الصودا الكاوية} \times ١٤ \times ١٠٠٠}{٢٥}$$

$$\text{عدد ملليجرامات النتروجين فى اللتر} = \frac{\text{عدد ملليمكافئات الصودا الكاوية} \times ١٤ \times ١٠٠٠}{٢٥}$$

الباب الرابع Lipids

الليبيدات

تعرف الليبيدات بأنها مجموعة من المواد العضوية ذات طبيعة دهنية وتتميز بعدم ذوبانها في الماء ولكنها تذوب في مذيبات الدهون مثل الأيثير والكلوروفورم والبنزين والهكسان كما أنها تستعمل في عمليات التمثيل في الكائنات الحية .

وتمثل الزيوت والدهون الجزء الأكبر من مجموعة الليبيدات وأكثرها إنتشارا حيث تكون الغالبية العظمى من الغذاء المخزون في أنسجة جسم الإنسان والحيوان وبذور ثمار النباتات .

وتشمل الليبيدات : الدهون والزيوت والشموع وبعض المركبات الأخرى المشتقة منها وتقسم الليبيدات تبعا لـ Bloor إلى الأقسام التالية :

أ - <u>الليبيدات البسيطة : Simple Lipids</u>

عبارة عن إسترات الأحماض الدهنية مع الكحولات

١ - الزيوت والدهون Fats and Oils

إسترات الأحماض الدهنية مع الجليسرول

٢ - الشموع Waxes

إسترات الأحماض الدهنية مع كحولات أخرى غير الجلسرول

أ - الــدرس العمــلــى الحــادى عشــر

---

١ - اختبار الأكرولون للجلسرول : Acrolin test for glycerol

عند تسخين الجلسرول لدرجة حرارة مرتفعة مع قليل من حامض الكبريتيك المركز وكبريتات البوتاسيوم الأيدروجينية أو كبريتات المغنسيوم أو حامض إكسيد الفوسفور (وهى مواد تنزع الماء بقوة Strong dehydrating agents يتكون الأكرولين تبعا للمعادلة الأتية:

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CHO \end{array} + 2\,H_2O$$

وتتطاير هذه المادة (الأكرولين)غلى درجة الحرارة المرتفعة وتتميز برائحتها النفاذة الكرية

الجواهر :

كبريتات بوتاسيوم ايدروجينية

أو حامض كبريتيك مركز

طريق الأختبار : Procedure

ب - الليبيدات المركبة : Complexed Lipids

عبارة عن إسترات أحماض دهنية مع كحولات ومحتوية على مجاميع أخرى بجانب الأحماض الدهنية والكحول .

١ - الفوسفوليبيدات Phospholipids

تحتوى بجانب الأحماض الدهنية والجليسرول على حمض الفوسفوريك ومركبات نتروجينية وبعض المكونات الأخرى ومن أمثلتها الليثين - السيفالين - الليسيوسيتول - وفوسفاتيديل السيرين - والبلازمالوجين - والأسفنجوميلين

٢ - الجليكو ليبيدات Glycolipids

عبارة عن مركبات من الأحماض الدهنية والجليسرول والكربوهيدرات وتحتوى على مركبات نتروجينية ولكنها لا تحتوى على حامض الفوسفوريك .

٣ - بعض الليبيدات المركبة الأخرى مثل الليبيدات المكبرتة Sulpholipids الليبيدات الأمينية Aminolipids والليبوبروتينات Lipoproteins .

جـ - الليبيدات المشتقة : Drived Lipids

وهى المواد المشتقة من المجموعات المختلفة السابقة نتيجة التحليل المائى وهى تشمل الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة والجلسرولات والأستيرولات وبعض الكحولات الأخرى . والدهيدات الأحماض الدهنية وغيرها .

ضع حوالى واحد جرام من كبريتات البوتاسيوم الأيدروجينية فى انبوبة اختبار وأضف اليها قليل من الجلسرول (نقطتين جلسرول) وسخن على اللهب المباشر باحتراس ولاحظ ابخرة الأكرولين النفاذة اعد التجربة اللسابقة باستعمال زيت الزيتون ودون استنتاجاتك .

٢ - إختبار دونستان للجلسرول Donstan's test

يكشف عن الجلسرول فى محلول التصبن بعد الترشيح يؤخذ ٣ مل من الراشح ويضاف إليها ٢ مل حمض مركز وبضع نقط كرومات بوتاسيوم ٥ ٪ وبعد الرج يظهر لون أزرق فاتح دلاله على الجلسرول .

٣ - إختبار ليبرمان بوركارد للكولستيرول:

Liebermann - Burchard test for cholesterol :

وهو إختبار حساس للكولسترول ويجرى باستعمال أندريد الخليك Acetic anhydride وحامض الكبرتيك ، فعند إضافة هذه الجواهر إلى محلول الكولستيرول فى الكلوروفورم أو بعض الإستيرولات الأخرى يتكون لون أخضر ، وقد إستعمل هذا الإختبار كأساس للتقدير الكمى للكولستيرول .

الجواهر المطلوبة : Reagents

١ - محلول الكولسترول فى الكلوروفورم .

٢ - أندريد حمض الخليك .

٣ - حامض كبريتيك مركز .

طريقة إجراء الإختبار Procedure

ضع فى إنبوبة إختبار ٢ سم من محلول الكولستيرول فى الكلوروفورم (إنبوبة نظيفة جافة) ثم أضف ١٠ نقط من أندريد حامض الخليك ونقطتين حامض كبريتيك مركز ولاحظ تلون المحلول باللون الأخضر تدريجيا .

(ب) - الأحمـــاض الدهنيـــة المشبعـــة وغيـــر المشبعـــة

الحمض الدهنى عبارة عن حمض عضوى عدد ذرات الكربون به زوجى عادة وقد تكون مشبع (اى لاتحتوى على روابط زوجية) او غير مشبع (يحتوى على روابط زوجية) وعدد ذرات الكربون به تبدأ بأربعة .

١ - اختبار الذوبان :

أ) الذوبان فى الماء :

تذوب الأحماض الدهنية ذات الوزن ألجزيئى المنخفضة (قصيرة السلسلة الكربونية) فى الماء ، وتقل هذه الخاصية بزيادة الوزن الجزيئى (زيادة طول السلسلة الكربونية) وبصفة عامة نجد أن معظم الأحماض الدهنية التى تدخل فى تركيب الجلسريدات (الزيوت والدهون) لا تذوب فى الماء وتكون طبقة طافية رقيقة فوق سطح الماء. ويرجع ذلك الى أن الحمض الدهنى يحتوى على مجموعة الكربوكسيل (قطبية) محبة للماء وسلسلة كربونية (غير قطبية) كارهة للماء.

اجراء الأختبار :

اضف حوالى ٠,٥جم من كل حمض دهنى مشبع (استياريك) وحمض دهنى غير مشبع (أوليك) وجلسريد متعادل (زيت او دهن) الى اختبار نظيفة تحتوى كل منها على ٣ملليلتر من الماء ترج جيدا، يلاحظ أن جميع المواد السابقة لاتذوب فى الماء ولكنها تطفو فوق سطح الماء

ب) الذوبان فى المذيبات العضوية :

تذوب الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة والجلسريدات المتعادلة (الزيوت والدهون) فى مجموعة المذيبات العضوية التى تسمى بمذيبات الدهون مثل الايثر والبنزين والكلوروفورم .

ولذا تستخدم مثل هذة المذيبات فى عملية استخلاص الزيوت والدهون من مصادرها الطبيعية وكذا الأحماض الدهنية بنوعيها وتختلف درجة ذوبان هذة المركبات فى مذيبات الدهون باختلاف التركيب الكيميائى لكل من المادة الليبيدية والمذيب .

اجراء الاختبار :

١ - اضف حوالى ٠,٥ جم من كل من المواد السابقة الى انابيب اختبار نظيفة تحتوى على ٣ ملليلتر من مذيب عضوى وترج جيدا ،يلاحظ ذوبان جميع المواد المذكورة فى المذيب العضوى .

٢ - اختبار البقعة الزيتية :

تعمل الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة ذات الوزن الجزيئى المرتفع وكذالك الجلسريدات (الزيوت والدهون) على زيادة شفافية السليلوز ، حيث يرجع ذلك الى مقدار هذة المواد على تخلل مسام

السليلوز وبالتالى تعمل على تكبير سطح جزيئات السليلوز وبذلك يصبح السليلوز شفافا .

اجراء الاختبار :

توضع نقطة من المادة الليبيدية (حمض دهنى غير مشبع وزيت بحمض دهنى مشبع ودهن بعد الانصهار) على ورقة ترشيح ، ثم تترك لمدة ٥ دقائق ثم دون ما تشاهده .

٣ -تكوين المستحلبات Emulsion :

عند رج المادة الليبيدية (حمض دهنى غير مشبع -مشبع -زيت -دهن منصهر) مع الماء تتفكك هذة الى حبيبات دقيقة تظل معلقة فى الماء وتعرف باسم المستحلب .ولكن هذه الحبيبات سرعان ما تتجح فىالتجمع مرة ثانية فى شكل طبقة تطفو فوق سطح الماء ،ولذلك يسمى هذا المستحلب (مستحلب مؤقت).ولكن عند اضافة بعض المواد مثل الصابون والمنظفات الصناعية - البروتينات -الاملاح المراريه أيدروكسيد الصوديوم) نجد انها تعمل على اضافه خاصيه الجذب السطحى لجذيئات الماء وبالتالى تمتص على سطح حبيبات الماده الليبيدية ويسمى هذا المستحلب (مستحلب مستديم) ولتكوين مثل هذة المستحلبات اهميه صناعيه وفى بعض العمليات الحيويه .

اجراء الاختبار :

يضاف حوالى ٠,٥ جم مادة ليبيدية الى انبوبه اختبار بها حوالى ٣ ملليلتر من الماء وترج جيدا يلاحظ ، تكون مستحلب . وعند ترك الانبوبة

لبعض الوقت نلاحظ تجمع حبيبات المادة الليبيدية فى صورة طبقهة فوق سطح الماء .

وعند إضافة ١ ملليلتر من محلـول ايدروكسيد الصوديوم الـى الأنبوبـه السابقه والرج جيا يلاحـظ عدم تجمـع حبيبـات المـادة الليبيديـة مـرة اخـرى بعـد تركها لبعض الوقت حيث يكون المستحلب المتكون دائما.

٤ – اختبار التصبن :

تتفاعل الاحماض الدهنيه المشبعه والغير مشبعه وكذلك الذيوت والدهون بعد تحليلها الى جليسرين واحماض دهنيه مع القلويات مثل $NaOH$, KOH مكونه املاح البوتاسيوم والصـوديوم للاحمـاض الدهنيـة والتـى تعرف بالصابون .

وتعرف هذه العمليه بعملية التصبن . ومعادلات التفاعل كما يلى :

أ) فى حاله الاحماض الدهنيه المشبعه والغير مشبعة :

$$R-COOH + NaOH \longrightarrow R-COONa + H_2O$$

ب) فى حالة الجليسريدات (الزيوت والدهون) :

$$\begin{array}{lcll}
CH_2O-OCR & & CH_2OH & \\
| & NaOH & | & \\
CHO-OCR & \longrightarrow & CHOH & + \quad 3\,R-COONa \\
| & or & | & \qquad or \\
CH_2O-OCR & K\,OH & CH_2OH & \quad 3R-COOK \\
\text{Triglyceride} & & \text{glycerol} & \text{faty acids (salts)}
\end{array}$$

إجراء الإختبار:

إخلط حوالى ١جم من الحمض الدهنى او الزيت او الدهن مع ٢٠مللتر من ايدروكسيد الصوديوم الكحولى فى دورق مع وضع قطع من الخزف الصغيره لتنظيم الغليان ثم ضع مكثف عاكس على الدورق ، ثم اغلى السائل لمدة ٣٠ دقيقة. تأكد من تمام التصبن وذلك بأخذ قطره من السائل ووضعها فى الماء فإذا تكون سطح إنفصال (طبقة زيتية) دل ذلك على عدم تمام عملية التصبن وفى هذه الحالة يعاد تسخين الدورق للغليان لفترة أخرى .

وبعد تمام عملية التصبن إفصل المكثف العاكس وسخن الدورق على حمام مائى حتى يتبخر الكحول.

وتجرى بعض التجارب للتعرف على خواص الصابون الناتج وهى :

١ - يؤخذ جزء من محلول الصابون الناتج فى أنبوبة إختبار ويضاف إليها قليل من الماء ويرج . يلاحظ ذوبان الصابون فى الماء وظهور رغوه واضحة .

٢ - يؤخذ جزء من محلول الصابون الناتج فى أنبوبة إختبار ويضاف إليه بضع نقط من حمض الكبريتيك المركز. يلا حظ إنفراد الأحماض الدهنية التى تطفو على السطح ، مما يدل على أن الصابون يتحلل بالأحماض المعدنية الى أحماض دهنية .

$$2R\text{-}COONa + H_2SO_4 \longrightarrow Na_2SO_4 + 2R\text{-}COOH$$

٣ - يؤخذ جزء من محلول الصابون الناتج فى انبوبة إختبار بها قليل من كلوريد الكالسيوم أو كبريتات المغنسيوم. يلاحظ تكوين راسب

واضح من املاح الكالسيوم أو المغنسيوم للأحماض الدهنية التى لاتذوب فى الماء .

$$2\ R\text{-}COONa + CaCl_2 \longrightarrow 2NaCl + (R\text{-}COO)_2\ Ca$$

$$2\ R\text{-}COONa + Mg\ SO_4 \longrightarrow Na_2SO_4 + (R\text{-}COO)_2\ Mg$$

٤ - يوخذ جزء من محلول الصابون الناتج الى انبوبة أختبار تحتوى على قليل من كلوريد الصوديوم. يلاحظ إنفصال الصابون على السطح وتسمى هذة العملية بعملية التمليح ، وتستخدم هذة الطريقة فى صناعة الصابون حيث يتجمع الصابون على السطح ويسهل فصله .

ملحوظه: الصابون العادى هو عباره عن صابون صوديومى ويكون صلبا ، أما الصابون البوتاسى فيكون رخوا (معجون الحلاقة) بينما الصابون الكالسيومى والباريومى والمغنسيومى غير قابل للذوبان فى الماء.

٥ - إختبار اليود :

تتفاعل الأحماض الدهنية والغير مشبعه سواء أكانت حرة أو مرتبطة فى صورة جلسريدات (الزيوت والدهون) مع الهالوجينات مثل اليود بالإضافة فى موضع الرابطة الزوجية ويختفى لون اليود ويتكون مركب عديم اللون .

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH \xrightarrow{I_2}$$

Oleic acid

$$CH_3 - (CH_2)_7 - \underset{\large I}{\underset{|}{CH}} - \underset{\large I}{\underset{|}{CH}} - (CH_2)_7 - COOH$$

9 , 10 - di - iodo stearic acid

وفى حالة الاحماض الدهنية المشبعة فأنها لاتفاعل مع اليود حيث انها لاتحتوى على روابط زوجية ، وبالتالى لا تكون عديمة اللون ويظل لون اليود كما هو عند إضافته إلى الحمض الدهنى المشبع .

ويستخدم هذا الإختبار للتمييز بين الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة .

اجراء الإختبار :

اذب حوالى ٠,٥جم من حمض دهنى فى ٥ ملليلتر مذيب عضوى فى انبوبة اختبار واضف اليها نقطة من محلول اليود الكحولى وترج الانبوبة جيدا ثم اضف بضع نقط من محلول النشا .يلاحظ فى حالة حمض الاوليك أو أى حمض دهنى غير مشبع يختفى لون اليود نتيجة إضافتة الىالروابط الزوجية وتكوين مركبات عديمة اللون . بينما فى حالة حمض الاستياريك أو أى حمض دهنى مشبع اخر فإن محتويات الأنبوبة تكتسب اللون الأزرق نتيجة عدم إمتصاص اليود بواسطة الحمض الدهنى وأمتصاصة على النشا حيث يتلون المحلول بلون ازرق .

٦ -اختبار بر منجنات البوتاسيوم :

يمكن اكسدة الأحماض الدهنيية الغير مشبعة وأستراتها بعدة عوامل مؤكسده مثل برمنجنات البوتاسيوم ، وحيث تتحول هذه الأحماض فى وجود الماء إلى الأحماض ثنائية الأيدروكسيل ويختفى لون البرمنجنات .

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH \xrightarrow[H_2O]{(O)}$$

Oieic acid

$$CH_3 - (CH_2)_7 - \underset{OH}{\underset{|}{CH}} - \underset{OH}{\underset{|}{CH}} - (CH_2)_7 - COOH$$

9 , 10 - di - hydroxy stearic acid

وبالمثل تعطى الأحماض الدهنية ذات الرابطتين الزوجيتين احماض رباعية الهيدروكسيل وهكذا .

ويستخدم هذا التفاعل للتميز بين الأحماض الدهنية المشبعه والغير مشبعة كذلك يستخدم فى تحديد موضع الرابطة الزوجية فى الحمض الدهنى الغير مشبع الغير معروف التركيب .

أجراء الإختبار :

يوضع حوالى ٠,٥ جم حمض دهنى فى انبوبه اختبار بها ٥ نقط من محلول كربونات الصوديوم ٥٪ وترج جيدا ثم يضاف ثلاث نقط من محلول برمنجنات البوتاسيوم ٠,١ ع وترج الأنبوبة جيدا .

يلاحظ أختفاء لون البرمنجنات (اللون البنفسجى) فى حالة الحمض الدهنى الغير مشبع ،بينما يظل لونها البنفسجى كما هو فى حالة الحمض الدهنى المشبع .

٧ -اختبار كشف التزنخ :

التزنخ التأكسدى :

تتأكسد الأحماض الدهنية الغير مشبعة سواء أكانت حرة أو مرتبطة فى صورة جلسريدات (زيوت ودهون) نتيجة إضافة الأكسجين (الهواء الجوى) عند الروابط الزوجية فى سلسلة الحمض الدهنى وتتكون مركبات تسمى البيروكسيدات التى تتحلل بعد ذلك إلى الدهيدات ذات وزن جزيئ متوسط وهى التى تسبب الطعم والرائحة الخاصتين بالتزنخ ويسمى بالتزنخ التأكسدى .

$$-CH_2-CH=CH-CH_2- \xrightarrow{O_2} -CH_2-\underset{|}{CH}-\underset{|}{CH}-CH_2-$$

$$O-O$$

Peroxide

إجراء الإختبار :

للكشف عن البيروكسيدات يذاب جرام من المادة الليبيدية المخزنة (حمض دهنى غير مشبع أو زيت دهن) فى ٥ مل مذيب عضوى فى انبوبة اختبار ، ثم يضاف ١ ملليلتر من محلول مشبع من يوديد البوتاسيوم فى حمض الخليك الثلجى . (يلاحظ انفراد اليود من يوديد البوتاسيوم) نتيجة لوجود الأكسجين الفعال فى صورة بيروكسيدات ويمكن الكشف عن اليود بأضافة بضع نقط من دليل النشا فيظهر لون أزرق بالأنبوبة .

وهناك إختبار اخر هو :

إختبار كريس Kreis

وفيه يتكون لون أحمر عند إضافة محلول فلوروجلوسينول فى الأيثير إلى المادة الليبيدية التى حدث بها تزنخ ثم إضافة حمض الإيدروكلوريك المركز.

إجراء الإختبار

يوضع ٢ جرام من المادة الليبيدية فى انبوبة إختبار ثم يضاف ٢ مل محلول ٠,١٪ فلوروجليسينول فى الأثير ويرج جيدا . يلاحظ تكون طبقة الحمض باللون الأحمر دليل على وجود الدهيددات بالمادة الليبيدية المتزنخه .

فلورجليسينول   ايبوكسى الدهيد   فلورجليسينول

مركب لونه أحمر

ب) التزنخ التحليلى :

اثناء عملية تخزين الزيوت والدهون فإنها تتعرض الى عدة عوامل طبيعية مثل الحرارة والرطوبة والضوء وغيرها مما يودى الى توفير الظروف الملائمة لعمل انزيم يحلل الروابط الأستيرية فى الجلسريدات مما يودى الى انفراد بعض الأحماض الدهنية اى تكون فى الحالة الحرة . وهى إحدى عمليات التزنخ فى الزيوت والدهون وتسمى بالتزنخ التحليلى . ويمكن الكشف عن حدوث هذا النوع من التزنخ فى الزيت أو الدهن عن طريق قياس كمية الحموضة المنفردة كما يلى :

اجراء الأختبار :

يوضع واحد جرام من كل زيت حديث الأستخلاص وزيت مخزن لفترة طويلة فى انبوبتى إختبار تحتوى كل منهما على ٣ ملليلتر مزيب عضوى (اثير أو بنزين) ثم يضاف الى كل انبوبة بضع نقط من دليل الفينولفثالين ثم تعادل الأحماض الدهنية المنفردة بمحلول مخفف من KOH أو Na OH .

يلاحظ أن الزيت المخزن يستهلك حجم أكبر من القلوى عنة فى حالة الزيت الحديث الإستخلاص مما يدل على وجود نسبة اكبر من الأحماض الدهنية المنفردة فى الزيت المخزن .

ملاحظات :

١ - فى حالة التزنخ التحليلى تتحلل الزيوت والدهون الى الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة منفردة وجلسرين ، ولهذا نجد أن الزيوت المتزنخة تزداد حموضتها كما تعطى تجارب موجبة مع أختبار خلات

النحاس . أما الزيوت والدهون الطازجة نتقل بها الحموضة ، ولاتعطى أختبار خلات النحاس.

٢ - فى حالة التزنخ التأكسدى تتكون بيروكسيدات وهذا يسهل الكشف عنها بإضافة يودور البوتاسيوم وحمض معدنى فينفرد اليود الذى يمكن التعرف علية بواسطة دليل النشا .

٣ - من السهل تزنخ الزيوت والدهون عند تعرضها للهواء والرطوبة ودرجات الحرارة العالية ومهاجمة البكتريا . ولذا ينصح بحفظ المواد الليبيدية فى أوانى جافة بعيدا عن الهواء وفى مكان منخفض الحرارة وبعيدا عن الضوء.

---

٨) - أختبارخلات النحاس

تتفاعل الاحماض الدهنية الحرة سواء أكانت مشبعة أو غير مشبعة مع أيونات النحاسيك نتيجة لوجود مجموعة الكربوكسيل الحرة فى الجزىء مكونة بذلك املاح النحاسيك للأحماض الدهنية . ويختلف ذوبان هذة الأملاح فى كل الماء والمذيبات العضوية فى حالة الأحماض الدهنية المشبعة عنها فى حالة الأحماض الغير مشبعة . أما إذا كانت هذة الأحماض متحدة فى الجلسريدات فإنها لاتتفاعل مع ايونات النحاسيك نتيجة لأرتباط مجاميع الكربوكسيل مع الجلسرين مكونة الجلسريدات ولذا يستخدم هذا الأختبار للتفرقة بين الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة وكذلك الجلسريدات المتعادلة (الزيت أو الدهن)

<u>اجراء الأختبار :</u>

يؤخذ ٠,٥ جم مادة ليبيدية فى انبوبة إختبار ثم ٣ ملليلتر مذيب عضوى ويرج ، ثم يضاف ٢ ملليلتر من محلول خلات النحاسيك وترج الأنبوبة جيدا .

يلاحظ فى حالة الحمض الدهنى المشبع (حمض الأستياريك) يتكون ملح النحاسيك للحمض الدهنى المشبع (لونة أخضر مزرق) وهو لايذوب فى كل من طبقة المذيب العضوى ولا الماء ولذلك يرسب فى قاع الانبوبة اى مع الزيادة من محلول خلات النحاسيك .ويكون الطبقة العليا عديمة اللون شفافة وهى عبارة عن المذيب العضوى .

اما فى حالة الحمض الدهنى الغير مشبع (حمض الأوليك) فيلاحظ تكون ملح النحاسيك للحمض الدهنى الغير مشبع الذى يذوب فى طبقة المذيب العضوى فتظهر الطبقة السفلى من الأنبوبة زرقاء شفافة (الزيادة من محلول خلات النحاسيك) وتظهر الطبقة العليا خضراء شفافة (ملح النحاسيك للحمض الدهنى الغير مشبع ذائب فى المذيب العضوى) .

اما فى حالة الحمض الدهنى حيث لايحدث تفاعل بين الأحماض الدهنية الداخلية فى تركيب الجلسريدات وايونات النحاسيك .

نجد أن الأنبوبة تحتوى على طبقتين ، السفلى لونها ازرق شفاف (لون محلول الدهن) .

التمـرين العلـمى الحـادى عشر

امامك زيت مشبع (جلسريد) - حمض دهنى مشبع - حمـض دهنـى غير مشبع - جلسرين - كوليسترول - والمطلوب اجراء الأختيـارات الوصفيـة السابقة على تلك المواد وتدوين نتائجك فى الجدول التالى (٢٣) : .

المادة	التجربة	المشاهدة	الإستنتاج

خطوات التميز بين الليبيدات

١- إختبارات عامة:

أ- إختبار الذوبان: جميع الليبيدات قابلة للذوبان فى المذيبات العضوية.

ب- إختبار البقعة الزيتية: جميع الزيوت والدهون تكون بقعة زيتية على ورق الترشيح.

جـ- إختبار التصبن: جميع الزيوت تتصبن بالقلويات.

٢- **إختبار الأكرولين:** يعطى نتيجة إيجابية مع الجليسريدات فقط.

٣- **إختبار اليود:** يميز بين الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة أو الجليسريدات التى تدخل فيها هذه الأحماض.

٤- **إختبار خلات النحاس:** يمكن التمييز بين الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة والجلسريدات.

٥- **إختبار دونستان:** لتميز الجليسرين عن الليبيدات والأحماض الدهنية.

التقديرات الكمية للزيوت والصابون:

تشمل تلك التقديرات ثوابت الزيوت وأهمها:

١- رقم الحامض Acid number:

٢- رقم التصبن Saponification number:

٣- المواد الدهنية غير المتصبنة Unsaponification matter:

٤- العدد اليودى Iodine value:

٥- رقم البيروكسيد Peroxide value:

٦- الأحماض الدهنية المتطايرة Volatile fatty acids:

وفيما يلى الطرق العملية المتبعة فى تقديرها والعمليات الحسابية اللازمة لكل تقدير.

١- رقم الحامض Acid number:

هو عبارة عن عدد المليجرامات من البوتاسا الكاوية (KOH) اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية المنفردة الموجودة فى جرام واحد زيت أو دهن.

الزيوت والدهون الحديثة التحضير والدهون الحيوانية تكون خالية تماما من الأحماض الدهنية المنفردة، أما الزيوت النباتية فتحتوى على كميات بسيطة من هذه الأحماض. ولكن كمية الأحماض الدهنية المنفردة تزداد تدريجيا بتخزينها نتيجة لعمليات الإنحلال ووجود هذه الأحماض المنفردة يكسب الزيوت طعما ورائحة كريهة غير مقبولة وتعرف حينئذ بالزيوت الزنخة.

المحاليل اللازمة:

محلول أيدروكسيد بوتاسيوم (مائى) معلوم القوة بالضبط (٠,٠٢ ع).

طريقة العمل:

١- يوزن بالضبط (بإستعمال الميزان الحساس) حوالى ٣-٥ جرام من عينة الزيت أو الدهن فى دورق مخروطى ثم يضاف إليها ٢٥ ملليلتر من الكحول أو رابع كلوريد الكربون.

ملحوظة:

أ- الدهون المتجمدة والشموع تذاب أولا بعد وزنها فى ٢٥ ملليلتر من الإيثير ثم يضاف إليها ٢٥ ملليلتر من الكحول.

ب- هذه المذيبات يجب أن تكون متعادلة تماما أو تعمل لها تجربة خالية (بلانك).

٢- أضف إلى الدورق بضع نقط من دليل الفينولفثالين ١٪، ثم نقط بعد ذلك محتويات الدورق بواسطة محلول أيدروكسيد بوتاسيوم معلوم القوة بالضبط (حوالى ٠,٠٢ ع) حتى ظهور أول لون قرمزى يستمر بضعة ثوان بعد رج المحلول بهدوء.

ملحوظة:

أ- يمكن إستعمال محلول ٠,٠١ ع بوتاسا كاوية إذا كانت درجة الحموضة للعينة منخفضة.

ب- الرج الشديد يساعد على زوال اللون بعد إنتهاء التعادل نظرا لأن الكمية الزائدة من أيدروكسيد البوتاسيوم عن معادلة الحامض يستهلك فى تصبن الجليسريدات المتعادلة وبذلك يرتفع رقم الحامض وتكون نتيجة التقدير خطأ.

العمليات الحسابية:

رقم الحامض = (حجم أيدروكسيد البوتاسيوم اللازمة للتعادل × عياريتها × ٥٦,١) / وزن عينة الزيت بالجرام

مثال:

أحسب رقم الحامض لزيت الكتان والنسبة المنوية للأحماض الدهنية المنفردة على صورة حمض أوليك - إذا علمت أنه لزم لمعادلة ٣,٥ جرام من عينة الزيت حجم قدره ٢٦,٣ ملليلتر أيدروكسيد بوتاسيوم ٠,٢ ع.

الحـــل

من المعلوم أن:

حجم أيدروكسيد البوتاسيوم بالملليلتر × عيارية أيدروكسيد البوتاسيوم = عدد المليمكافئات

∴ عدد المليمكافئات × الوزن المكافىء = عدد المليجرامات

∴ رقم الحامض لزيت الكتان = (٢٦,٣ × ٠,٢ × ٥٦,١) / ٣,٥ = ٨٤,٢

لحمض الأوليك فى عينة زيت الكتان = (٢٦,٣ × ٠,٢ × ٢٨٢ × ١٠٠) / (٣,٥ × ١٠٠٠) = ٤٢,٣٪

ملحوظة:

١- عدد مكافئات البوتاسا الكاويا التى لزمت التعادل = عدد مكافئات حامض الأولييك.

٢- الوزن المكافىء لأيدروكسيد البوتاسيوم = ٥٦,١.

٣- الوزن المكافىء لحمض الأولييك = ٢٨٢.

٢- تقدير رقم التصبن للزيوت والدهون:

الزجاجة (أ) بها عينة من زيت القطن. والمطلوب تقدير رقم التصبن لهذه العينة.

تعريف رقم التصبن Saponification number:

هو عدد ملليجرامات البوتاسا الكاويا (أيدروكسيد البوتاسيوم) اللازمة لتمام تصبن جرام واحد من الزيت أو الدهن أو الشمع.

المحاليل اللازمة:

١- محلول ٠,٥ ع حامض أيدروكلوريك معلوم القوة بالضبط.

٢- محلول أيدروكسيد بوتاسيوم كحولى ٠,٥ ع معلوم القوة بالضبط.

يحضر هذا المحلول بإذابة ٢٨ جرام من أيدروكسيد البوتاسيوم فى أقل كمية ممكنة من الماء المقطر ثم يترك المحلول حتى يبرد تماما. ثم يكمل المحلول حتى حجم لتر بكحول إيثيلى ثم يترك المحلول لمدة ٢٤ ساعة ثم يرشح المحلول فى زجاجات بنية اللون وتسد جيدا (وذلك لعدم تعريض المحلول للضوء أو الهواء الجوى بقدر الإمكان) لحين إستعمالها.

طريقة العمل:

١. يوزن بالضبط من ٢-٣ جرام من عينة الزيت أو الدهن فى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ ملليلتر ثم يضاف إليها بالماصة ٢٥ ملليلتر من محلول أيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية معلومة القوة بالضبط.
٢. رج الدورق جيدا ثم ثبت على فوهته عاكس وسخن فى حمام مائى لمدة نصف ساعة (فى حالة الشموع تستمر فى التسخين لمدة ساعتين) ويلاحظ أن يرج الدورق بين وقت وأخر إلى أن يتم التصبن ويستدل على تمام التصبن بأن يصبح المحلول رائق تماما.
٣. يرفع المكثف ويضاف إلى الدورق وبعد التبريد بضعة نقط من دليل الفينولفثالين ثم تجرى معادلة الزيادة من القوة بواسطة حمض الأيدروكلوريك المعلوم القوة والسابق تحضيره.
٤. تعاد نفس التجربة السابقة (مع عدم إضافة الزيت) بإستعمال نفس الكمية من أيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية وتعامل بنفس المعاملة السابقة - ولهذه التجربة

الخالية (بلانك) أهمية كبيرة بحيث أنها تبعد تأثير ثانى أكسيد الكربون الذى قد يكون ذائبا فى المحلول.

هذا إلى جانب أهميتها فى العمليات الحسابية لتقدير رقم التصبن فى حالة إستعمال أيدروكسيد بوتاسيوم مجهول العيارية.

العمليات الحسابية:

هناك عدة طرق لحساب رقم التصبن اساسها العلمى واحد وفيما يلى الطريقتين المتبعتين فى هذا المجال:

الطريقة الحسابية الأولى:

تتبع فى حالة إستعمال أيدروكسيد بوتاسيوم للتصبن مجهول القوة.

$$\text{رقم التصبن} = \frac{\text{ح١} - \text{ح٢} \times \text{ع} \times \text{٥٦,١}}{\text{وزن عينة الزيت بالجرام}}$$

ح١ = حجم حمض الأيدروكلوريك المستعمل فى التعادل (بلانك).

ح٢ = حجم حمض الأيدروكلوريك المستعمل فى التعادل (تجربة).

ع = عيارية حمض الأيدروكلوريك.

٥٦,١ = الوزن المكافىء لأيدروكسيد البوتاسيوم.

ملحوظات هامة:

١. يشترط لتطبيق المعادلة السابقة أن يكون حجم أيدروكسيد البوتاسيوم المستعمل فى التجربة الخالية (بلانك) هو نفس الحجم المستخدم مع عينة الزيت (تجربة).

٢. فى وجود عينة الزيت (تجربة) فإن عدد المكافئات لأيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية المضافة لإجراء عملية التصبن جزء منها يستهلك فى عملية التصبن والجزء المتبقى منها هو الذى يعادل بعض الأيدروكلوريك (ح٢).

٣. فى التجربة الخالية (بلانك) فإن عدد مكافئات أيدروكسيد البوتاسيوم المستعملة تساوى عدد مكافئات حمض الأيدروكلوريك الذى لزم للتعادل (بلانك).

وعلى ذلك فإن الفرق بين عدد مكافئات حمض الأيدروكلوريك فى التجربة الخالية (بلانك) والتجربة الأساسية يعبر عن عدد مكافئات أيدروكسيد البوتاسيوم

المستهلك فى تصبن الزيت ومنه يمكن حساب رقم التصبن للعينة كما فى المعادلة السابقة.

الطريقة الحسابية الثانية:

تتبع فى حالة إستعمال أيدروكسيد بوتاسيوم للتصبن معلوم القوة - وفى هذه الحالة لا تجرى عادة التجربة الخالية (بلانك) ولهذه الطريقة أهميتها من ناحية توفير محاليل البوتاسا الكحولية ولكنها أقل دقة من الطريقة الأولى.

$$\text{رقم التصبن} = \frac{\{(ح_1 \times ع_1) - (ح_2 \times ع_2)\} \times 56.1}{\text{وزن عينة الزيت بالجرام}}$$

$ح_1$ = حجم أيدروكسيد البوتاسيوم المستعمل فى التصبن.

$ع_1$ = عيارية أيدروكسيد البوتاسيوم.

$ح_2$ = حجم حمض الأيدروكلوريك اللازم للتعادل بعد تمام عملية التصبن.

$ع_2$ = عيارية حمض الأيدروكلوريك.

٥٦,١ = الوزن المكافىء لأيدروكسيد البوتاسيوم.

مثال حسابى:

فى تجربة لتقدير التصبن لعينة زيت وزنها ٣,٢ جرام - اضف ٢٥ ملليلتر من أيدروكسيد البوتاسيوم الكحولية ٠,١٢ لتصبن العينة لزم لمعادلة الزيادة من البوتاسا الكاوية بعد تمام عملية التصبن ٢٨ ملليلتر حمض أيدروكلوريك ٠,٨٦ ع - إحسب رقم التصبن للعينة.

الحـــل

$$\text{رقم التصبن} = \frac{(\text{عدد مكافئات البوتاسا الكاوية} - \text{عدد مكافئات الحمض}) \times 56.1}{\text{وزن عينة الزيت بالجرام}}$$

$$= \frac{[(25 \times 0.12) - (28 \times 0.086)] \times 56.1}{3.2}$$

<u>ملحوظة:</u> رقم التصبن = رقم الأستر + رقم الحامض.

ولتعيين رقم الإستر يطرح رقم الحامض من رقم التصبن - ويمكن إعتبار رقم التصبن مساويا لرقم الإستر إذا كان رقم الحامض مساويا صفر.

٣- المواد غير المتصبنة Unsaponifiable matters:

وهى توضح كمية المواد غير المتصبنة فى الزيت أو الدهن والتى تذوب فى الإثير ويمكن تقديرها بعد إجراء التصبن بإستخلاصها بالإثير وتقدير نسبتها فى العينة وهى تشمل الإستيرولات والكحولات والهيدروجينات المكربنة وعادة توجد هذه المواد بكميات قليلة فى الزيوت الناتجة من البذور أو دهون الحيوانات حيث توجد فى حدود (٠,٤-١,٥٪).

٤- العدد اليودى Iodine value:

تقدير العدد اليودى للزيوت والدهون بطريقة ويج:

تعريفه: ويعرف بأنه [عدد جرامات اليود التى يمتصها ١٠٠ جم من الدهن أو الزيت] ولتقديره علاقة بالأحماض الدهنية غير المشبعة فهو يوضح درجة عدم التشبع وكلما زادت عدد الروابط الزوجية فى الأحماض المكونة للدهن أو الزيت يزداد العدد اليودى.

الفكرة الأساسية:

يكون اليود مركبات إضافية بإتحاده مع الروابط الزوجية الموجودة فى الأحماض الدهنية الغير مشبعة الداخلة فى تكوين الجليسريدات. وعلى ذلك فإن كمية اليود المستهلكة تتناسب تناسبا طرديا مع عدد الروابط الزوجية فى المادة الدهنية.

المحاليل اللازمة:

١. محلول ويج اليودى ويحضر بإذابة ١٢,٦ جرام من اليود وتذاب فى حامض خليك ثلجى ويكمل الحجم إلى لتر بحامض الخليك. يقسم المحلول إلى قسمين متساويين ويمرر كلور جاف فى أحدهما حتى يصبح لونه مائل للأحمرار. وعند تنقيطه بمحلول ثيوكبريتات صوديوم عيارى يستهلك الحجم منه ضعف الكمية من الثيوكبريتات التى سبق أن إستهلكت لنفس الحجم قبل تمرير الكلور. بعد ذلك يخلط القسمين على بعض ويرج المحلول جيدا. المحلول الناتج هو

محلول ويج اليودى المستخدم لتقدير الروابط الزوجية الموجودة فى الأحماض الدهنية الداخلة فى تركيب الزيوت والدهون.

والفكرة الأساسية فى تكوين محلول اليود بهذه الطريقة أن هاليدات اليود تتفاعل مع الروابط الزوجية أسرع من اليود ويعتبر محلول ويج عبارة عن ثالث كلوريد اليود مذاب فى حامض خليك ثلجى.

٢. محلول ثيوكبريتات صوديوم $Na_2S_2O_3$ ٠,١ ع معلوم القوة بالضبط.

٣. كلورفورم (مذيب).

٤. محلول نشا ١٪ (دليل) ويحضر بإذابة (جرام نشا ذائب فى ١٠٠ ملليلتر ماء مقطر يغلى مع التقليب المستمر لبضعة دقائق (فى حالة إستعمال نشا غير ذائب يرشح المحلول قبل الإستعمال).

طريقة العمل:

١. زن بالضبط كمية من الزيت أو الدهن (٠,٣–٠,٥ جرام) فى دورق مخروطى سعة ٢٥٠ ملليلتر وله غطاء زجاجى محكم فى حالة عدم توفر مثل هذا الدورق يمكن إستخدام زجاجات جواهر كشافة بغطاء مصنفر.

٢. أضف حوالى ٢٥ ملليلتر من الكلوروفورم (مذيب) ثم أضف ٧٥ ملليلتر بالضبط من محلول ويج اليودى – سد الدورق مباشرة ورجه جيدا ثم ضعه لمدة نصف ساعة فى مكان مظلم.

٣. لأخرج الدورق من المكان المظلم ونقط محتوياته بواسطة محلول ثيوكبريتات الصوديوم المعلوم القوة – وعندما يصل لون المحلول بالدورق إلى اللون الأصفر الفاتح أضف حوالى ملليلتر من دليل النشا – رج الدورق جيدا ثم إستمر فى إضافة محلول الثيوكبريتات مع الرج حتى زوال اللون الأزرق.

٤. أجر تجربة خالية (بلانك مصاحبة للتجربة الأصلية السابقة تماما بدون إضافة الزيت وذلك لتقدير المكافئات الكلية لليود الذى أضيف للتفاعل مع الزيت فى التجربة الأصلية).

العمليات الحسابية:

$$\text{العدد اليودى} = \frac{(ح١ - ح٢) \times ع \times ١٢٦,٩ \times ١٠٠}{١٠٠٠ \times \text{وزن العينة}}$$

حيث أن:

ح١ = حجم الثيوكبريتات بالملليلتر اللازمة للتعادل فى التجربة الخالية (بلانك).

ح٢ = حجم الثيوكبريتات بالملليلتر اللازمة للتعادل فى التجربة الأصلية.

١٢٦,٩ = الوزن المكافىء لليود.

٥- رقم البيروكسيد Peroxide value:

يعتبر رقم البيروكسيد مقياس لما يحتويه الزيت أو الدهن من الأكسجين الفعال فى صورة ملليمكافىء من الأكسجين أو ملليمول من البيروكسيد فى كل كيلو زيت أو دهن.

٦- الأحماض الدهنية المتطايرة Volatile fatty acids:

تقدر الأحماض الدهنية المتطايرة بتحليل وزنة معينة من الزيت أو الدهن بالقلويات ثم يعامل ناتج التحليل المائى بحامض معدنى غير متطاير (حمض كبريتيك) حتى يصير المحلول ناتج التقطير الذى يحتوى الأحماض المتطايرة وهى التى تتكون من (C_4 to C_{12}) وعادة تفصل الأحماض المتطايرة القابلة للذوبان فى الماء من الأحماض المتطايرة غير القابلة للذوبان فى الماء ويقدر كل منها على حدة ويوضح مقدارها كما يلى:

أ- رقم ريخرت-ميزل Reichert-Meissel number:

وهو يوضح مقدار الأحماض الدهنية المتطايرة القابلة للذوبان فى الماء ويعرف هذا بأنه [عدد السنتيمترات المكعبة من محلول أيدروكسيد بوتاسيوم (0.1 N) اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية المتطايرة الذائبة فى الماء التى تنتج من تصبن ٥ جرام زيت أو دهن].

ب- رقم بولنسكى Polenske number:

وهو يوضح مقدار الأحماض الدهنية المتطايرة غير القابلة للذوبان فى الماء (C_6 to C_{12}) ويعرف بأنه [عدد السنتيمترات المكعبة من محلول أيدروكسيد بوتاسيوم (0.1 N) اللازمة لمعادلة الأحماض الدهنية المتطايرة غير القابلة للذوبان فى الماء التى تنتج من تصبن ٥ جرام زيت أو دهن].

الـــدرس العمـــلى الثــانى عشــر
الجـــدول العـــام للكشـــف عـــن المجهـــول
(كربوهيدرات - بروتين - ليبيد - جليسرول)

المجهول
إختبار الإمتزاج مع الماء

(+) يمتزج مع الماء
سكر - بروتين - جلسرين

إختبار موليش

- مادة كربوهيدراتية
  - ٣ - اليود
    - لا تغيير فى اللون سكريات
      - ٤ - تجارب الإختزال (فهلنج - بندكت)
        - +
          سكريات مختزلة
          - ٥ - بارفويد
            - + أحادى مختزل
              - ٦ - سليفانوف (+ كيتوهكسوز فراكتوز) - الدوهكسوز جلوكوز - جالكتوز
            - - ثنائى مختزل (لاكتوز - مالتوز)
        - -
          سكريات غير مختزلة
          - ٥ - تحليل مائى
            - ٦ - تجارب الإختزال
              +
              سكروز
    - أزرق نشا
    - بنى قاتم دكسترين
- بروتين - جليسرين
  - ٣ - البيوريت
    - + بروتين تجرى إختبارات المادة البروتينية
    - - جليسرين ٤ - دونستان + (جليسرين)

(-) لا يمتزج مع الماء
سطح إنفصال
دهن

إختبار خلات النحاس

- طبقتين إحداهما بها راسب حمض دهنى مشبع
- طبقتين رائقتين إحداهما لونها أخضر
  - حمض دهنى غير مشبع
- طبقتين رائقتين جلسريد أو زيت أو دهن متعادل

تمرين: أمامك مجهولين سائلين لمادة حيوية والمطلوب إجراء الإختبارات اللازمة للتعرف عليهما.
محاليل رقم:

التجربة	مجهول (أ)		مجهول (ب)	
	المشاهدة	الإستنتاج	المشاهدة	الإستنتاج

أمامك مجهول لمادة حيوية والمطلوب إجراء الإختبارات الوصفية للتعرف عليها ودون نتائجك فى جدول (٢٤) .

التجربة	المشاهدة	الإستنتاج